

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年5月17日 (17.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/34766 A2

- (51) 国際特許分類⁷: C12N (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/00631 (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, RU, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (22) 国際出願日: 2001年1月31日 (31.01.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平 2000-245910
2000年8月14日 (14.08.2000) JP
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 松田道行 (MATSUDA, Michiyuki) [JP/JP]; 〒156-0054 東京都世田谷区桜丘4-6-11 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 弁理士 細田芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒540-0012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目8番1号 大手前M2ビル 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).
- 添付公開書類:
— 出願人の請求に基づく第21条(2)(a)による期間経過前の公開。
— 国際調査報告書なし; 報告書を受け取り次第公開される。
— 分類なし; 国際調査機関により点検されていない発明の名称及び要約。

[続葉有]

(54) Title: PROTEIN MONITORING THE ACTIVITY OF SMALL GTP-BINDING PROTEIN

(54) 発明の名称: 低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質

(57) Abstract: A protein monitoring the activity of a small GTP-binding protein which makes it possible to measure the activation of a non-invasive small GTP-binding protein; a gene encoding the above protein; an expression vector containing the above gene; a transformed cell and a transgenic animal expressing the above protein and carrying the above expression vector which is useful in measuring the activation of a non-invasive small GTP-binding protein; and a method of measuring the activation of a small GTP-binding protein by using the above protein.

(57) 要約:

本発明は、非侵襲的な低分子量GTP結合タンパク質の活性化の測定を可能にする低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質; 該タンパク質をコードする遺伝子; 該遺伝子を含む発現ベクター; 前記タンパク質を発現し、非侵襲的な低分子量GTP結合タンパク質の活性化の測定に有用な前記発現ベクターを保持する形質転換された細胞およびトランスジェニック動物; ならびに前記タンパク質を用いる低分子量GTP結合タンパク質の活性化を測定する方法を提供するものである。

WO 01/34766 A2



2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質

技術分野

本発明は、低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子を含む発現ベクター、該発現ベクターを保持する形質転換された細胞およびトランスジェニック動物、ならびに前記タンパク質を用いる低分子量GTP結合タンパク質の活性化を測定する方法に関する。

従来の技術

細胞内情報伝達分子には非常に多くの種類が知られており、低分子量GTP結合タンパク質（以下、GTP結合タンパク質という場合がある）はその中でも種類が多いこと、重要な分子スイッチとして働いていることから非常に詳しく解析されてきている。低分子量GTP結合タンパク質群はRasファミリー、Rhoファミリー、Rabファミリー、Ranファミリーなどからなる（文献1）。これらの低分子量GTP結合タンパク質は、細胞増殖、細胞骨格、細胞内輸送、核輸送など細胞内での多様な情報伝達を制御する重要な分子スイッチである。低分子量GTP結合タンパク質は、GDPに結合している不活性化型とGTPに結合している活性化型との間をサイクルしている（第1図）。GTP結合型はそれぞれのGTP結合タンパク質に特異的な標的タンパク質に結合し、該標的タンパク質を活性化する。GDP結合型をGTP結合型にする反応を触媒するタンパク質はグアニンヌクレオチド交換因子であり、GTP結合型をGDP結合型に戻す反応を触媒するタンパク質はGTP水解促進酵素（GTPアーゼ活性化因子）である。該GTP水解促進酵素は、結合したGTPの加水分解を促進し、無機リン酸を遊離させてGDPを生じさせるように働く。

最近、多くの低分子量GTP結合タンパク質およびその活性化因子と不活性化因子が単離されるにおよび、これら低分子量GTP結合タンパク質が細胞内および個体内でどのような機能的差異があるのかに注目が集まっている。その機能的差異を明らかにするためには、細胞内および個体内での低分子量GTP結合タンパク質の活性化状態をモニターする必要がある。

細胞内での低分子量GTP結合タンパク質の活性化の程度を調べるには、細胞内での低分子量GTP結合タンパク質のGTP結合型とGDP結合型の量比を知る必要がある。現在、細胞内での低分子量GTP結合タンパク質のGTP結合型とGDP結合型の量比を調べる方法としては次の二つがよく用いられている。

(1) ラジオアイソトープ ^{32}P iによる標識を利用する方法：細胞を ^{32}P iで標識したのち低分子量GTP結合タンパク質を精製し、結合しているGTPおよびGDPを薄層クロマトグラフィーにて分離し定量する（文献2）。

(2) ブルダウン法：低分子量GTP結合タンパク質に結合する標的タンパク質を固層に結合させておき、可溶化した細胞抽出液と混合する。GTP結合型のものは標的タンパク質に高いアフィニティーで結合するので、GTP結合型のみを選択的に回収することができる。これを、SDS-PAGEゲルにて分離した後、イムノブロッティングにて定量する（文献3）。しかしながら、いずれの方法も細胞を一旦可溶化する必要があり、生細胞で直接、低分子量GTP結合タンパク質の活性化を調べる方法はこれまでなかった。

細胞内には、細胞膜、細胞質以外にも多くの細胞内小器官が存在するだけでなく、細胞質の中でも異なる場所では異なる生化学的現象が起きていることが近年明らかにされている。また、個体レベルでも低分子量GTP結合タンパク質が高次神経機能や器官形成に非常に重要であるということがわかっている。したがって、低分子量GTP結合タンパク質の活性化状態を細胞内あるいは個体内で非侵襲的に知ることは、生命現象の理解のみならず、薬剤開発などにおいても必須である。しかし、これまでの生化学的方法では細胞を可溶化してしまうため、細胞

内のどの場所で低分子量GTP結合タンパク質が活性化されているのか、また、どの細胞で低分子量GTP結合タンパク質が活性化されているのかを知ることはできなかった。

一方、生細胞においてタンパク質を可視化する技術としてはGFP (green fluorescent protein) を用いる方法が知られている(文献4)。GFPは発光クラゲなどより単離されるタンパク質群で、主に緑色の蛍光を発するタンパク質である。現在、細胞内でのタンパク質の局在を調べるのに広く用いられている。GFPとしてはCFP (cyan-emitting mutant of GFP)、YFP (yellow-emitting mutant of GFP) などがあり、また、それらを改良したタンパク質としてEGFP (enhanced green fluorescent protein)、ECFP (enhanced CFP)、EYFP (enhanced YFP)、EBFP (enhanced blue-emitting mutant of GFP) など(本明細書において、これらをまとめてGFP関連タンパク質という)がある。これらは、それぞれ異なる波長の光で励起され、異なる波長の蛍光を放出する。

さらにGFPを応用した技術としてFRET (fluorescent resonance energy transfer) を用いるものがある(文献5)。FRETとは以下の現象を指す。蛍光物質AおよびBという物質がそれぞれ λ_{aex} および λ_{bex} で励起され、 λ_{aem} および λ_{bem} の光をそれぞれ発光するとする。この時、AおよびBがごく近傍に存在し、 λ_{aem} が λ_{bex} に十分に近い時、AおよびBの混合物に λ_{aex} の光を照射すると、物質AのエネルギーがBに吸収され λ_{bem} の発光が観察される。これをFRETという。この方法を利用して、2分子間の距離を推定することもできる。この時、蛍光物質Aをドナー、蛍光物質Bをアクセプターという。

さらにこの技術の応用として、二つの蛍光物質を一つのタンパク質内に標識することにより、タンパク質の構造変化を検出することが可能である。EBFPおよびEGFP、ECFPおよびEYFPの2セットのGFP関連タンパク質は、至適なFRETのためのドナーとアクセプターの組み合わせを作ることが知られ

ている。たとえば、EBFPとEGFPとの二つのタンパク質とカルシウム結合タンパク質カルモジュリンとの融合タンパク質で、このFRET技術を応用してカルシウムの濃度を測りうることが知られている（文献6）。しかしながら、GFPタンパク質とFRET技術とを応用した1分子モニターによる測定法は、前記カルシウム測定ならびにサイクリックAMP依存性リン酸化酵素の活性測定以外には、現時点では成功していない。

発明の開示

本発明は、非侵襲的な低分子量GTP結合タンパク質の活性化の測定を可能にする低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質；該タンパク質をコードする遺伝子；該遺伝子を含む発現ベクター；前記タンパク質を発現し、非侵襲的な低分子量GTP結合タンパク質の活性化の測定に有用な前記発現ベクターを保持する形質転換された細胞およびトランスジェニック動物；ならびに前記タンパク質を用いる低分子量GTP結合タンパク質の活性化を測定する方法、より詳しくは生細胞においても使用可能な、低分子量GTP結合タンパク質のGTP結合型とGDP結合型の量比を測定する方法を提供することを目的とする。

すなわち、本発明の要旨は、

〔1〕 低分子量GTP結合タンパク質の全部または一部、該低分子量GTP結合タンパク質の標的タンパク質の全部または一部、GFPアクセプタータンパク質の全部または一部、及びGFPドナータンパク質の全部または一部が、各タンパク質の機能を発揮し得る状態で直接または間接的に連結されてなる融合タンパク質からなる低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質、

〔2〕 前記〔1〕記載の低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質をコードする遺伝子、

〔3〕 前記〔2〕記載の遺伝子を含む発現ベクター、

〔4〕 前記〔3〕記載の発現ベクターを保持してなる形質転換された細胞、

- 〔５〕 前記〔３〕記載の発現ベクターを保持してなるトランスジェニック動物、
- 〔６〕 前記〔１〕記載の低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質におけるFRETを検出する工程を含む低分子量GTP結合タンパク質の活性化を測定する方法、
- 〔７〕 前記〔４〕記載の細胞または前記〔５〕記載のトランスジェニック動物におけるFRETを検出する工程を含む低分子量GTP結合タンパク質の活性化を測定する方法、
- に関する。

図面の簡単な説明

第１図は、低分子量GTP結合タンパク質の活性制御機構を示す。本図では、低分子量GTP結合タンパク質としてRasを例にとり、低分子量GTP結合タンパク質の活性制御機構を模式的に示してある。低分子量GTP結合タンパク質はGDPに結合していると不活性化型であり、ここにグアニンヌクレオチド交換因子（GEF）が作用するとGDPがGTPに置換され、活性化型となる。活性化されたGTP結合タンパク質は構造変化を起こし、その特異的な標的タンパク質と結合し、それを活性化できるようになる。活性化型の低分子量GTP結合タンパク質はGTP水解促進酵素（GAP）存在下にGTPがGDPに水解され、無機リン酸（Pi）を遊離し、もとの不活性化型に戻る。

第２図は、FRETを利用した低分子量GTP結合タンパク質の活性化測定法の原理を示す。この図では低分子量GTP結合タンパク質としてRasを、標的タンパク質としてRafを例にとっている。GFPドナータンパク質として例示するCFP(cyan-emitting mutant of GFP)は433nmの光で励起され、475nmを極大とする光を放射する。一方、GFPアクセプタータンパク質として例示するYFP(yellow-emitting mutant of GFP)は505nmの光で励起され

530 nmを極大とする光を放射する。なお、本発明においては、GFPアクセプタータンパク質および／またはGFPドナータンパク質として、これらを用いることもできる。第2図中の下図に示すように、Rasの活性化前には、モニタータンパク質において、アミノ末端側に存在するYFPとカルボキシル末端側に存在するCFPとが離れているのでCFPからYFPへのエネルギーの移行はあまり起きない。ところが、何らかの刺激を受けて〔たとえば、上皮細胞増殖因子(EGF)の添加〕Rasが活性化型になると、標的タンパク質RafのRas結合領域(RBD)に結合するので、YFPとCFPが近傍に来て、その結果、CFPからYFPへのエネルギーの移行、それに伴うYFPからの530 nmの蛍光が観察されるようになる。従って、刺激前後(すなわち、Rasの活性化前後)におけるFRET効率を測定することにより、Rasの活性化を測定することができる。

第3図は、プラスミドpRafras1722の構造を示す。発現ベクターはすでに報告されているpCAGGSを用いた。図中のCAGプロモーターの下流にEYFP-Ras-RafRBD(Ras結合領域)-ECFPの順となる融合タンパク質をコードするcDNAを結合した。

第4図は、プラスミドpRafras1722の翻訳領域の塩基配列および予測されるアミノ酸配列を示す。

第5図は、プラスミドpRafras1722の翻訳領域の塩基配列および予測されるアミノ酸配列(つづき)を示す。

第6図は、プラスミドpRafras1722の翻訳領域の塩基配列および予測されるアミノ酸配列(つづき)を示す。

第7図は、発現タンパク質Rafras1722の蛍光プロフィールを示す。HEK293T細胞にpRafras1722とグアニンヌクレオチド交換因子Sos発現ベクター(pCAGGS-mSos)あるいはGTP水解促進酵素Gap1m発現ベクター(pEF-Bos-Gap1m)をリン酸カルシウム法に

てトランスフェクトし、48時間培養後に細胞を可溶化し、遠心分離後、上清を得た。該上清について励起波長433nmにて、波長450nm～550nmにおける蛍光強度を蛍光分光光度計にて測定した。第7図に示すグラフの右囲みにおけるSosはpRafras1722とpCAGGS-mSosを共にトランスフェクトした場合におけるRafras1722の蛍光プロフィールであることを、Gap1mはpRafras1722とpEF-Bos-Gap1mを共にトランスフェクトした場合におけるRafras1722の蛍光プロフィールであることを示す。

第8図は、発現タンパク質Rafras1722のGTP結合タンパク質上のGTPとGDPの比〔 $GTP / (GDP + GTP)$ (%)〕に対する励起波長433nmでの波長475nmと波長530nmの蛍光強度比（波長530/475）を示す。HEK293T細胞にpRafras1722と様々な量のグアニンヌクレオチド交換因子Sos発現ベクター（pCAGGS-mSos）あるいはGTP水解促進酵素Gap1m発現ベクター（pEF-Bos-Gap1m）をトランスフェクトした。48時間培養後に³²Pi標識し、Rafras1722を抗GFP抗体で免疫沈降した後に、Rafras1722に結合しているGTPおよびGDPを薄層クロマトグラフィーで分離、定量した。一方、同様に処理した細胞可溶化液について蛍光プロフィールを測定し、励起波長433nmでの波長475nmと波長530nmの蛍光強度比を測定した。Rafras1722上のGTPの量に依存して蛍光強度比が増強されることが分かる。

第9図は、発現タンパク質Rafras1722を発現する細胞株が得られたことを示す。NIH3T3細胞にpRafras1722をトランスフェクトし、細胞株3T3-Rafrasを樹立した。細胞を可溶化し、抗GFP抗体を用いてイムノブロッティングにてRafras1722の発現について解析した。第9図に示すイムノブロッティングの左には分子量マーカを示す。

第10図は、3T3-Rafras細胞を用いたRas活性化の解析を示す。

3 T 3 - R a f r a s 細胞を E G F (1 μ g / m l) で刺激し、その前後で 4 3 3 n m の波長で励起した蛍光プロフィール (波長 4 5 0 n m ~ 5 5 0 n m) を測定した。

第 1 1 図は、プラスミド p R a i - c h u 3 1 1 の構造を示す。バックボーンとなるベクターの構造は第 3 図と同一である。

第 1 2 図は、プラスミド p R a i - c h u 3 1 1 の翻訳領域における塩基配列および予測されるアミノ酸配列を示す。

第 1 3 図は、プラスミド p R a i - c h u 3 1 1 の翻訳領域における塩基配列および予測されるアミノ酸配列 (つづき) を示す。

第 1 4 図は、プラスミド p R a i - c h u 3 1 1 の翻訳領域における塩基配列および予測されるアミノ酸配列 (つづき) を示す。

第 1 5 図は、発現タンパク質 R a i - c h u 3 1 1 の蛍光プロフィールを示す。H E K 2 9 3 T 細胞に p R a i - c h u 3 1 1 とグアニンヌクレオチド交換因子 C 3 G 発現ベクター (p C A G G S - C 3 G ; 文献 9 に記載) あるいは G T P 水解促進酵素 r a p 1 G A P I I 発現ベクター (p C A G G S - r a p 1 G A P I I ; 文献 9 に記載) とをリン酸カルシウム法にてトランスフェクトし、4 8 時間培養後に細胞を可溶化し、遠心分離後、上清を得た。該上清について励起波長 4 3 3 n m にて、波長 4 5 0 n m ~ 5 5 0 n m における蛍光強度を蛍光分光光度計にて測定した。第 1 5 図に示すグラフの右囲みにおける C 3 G は p R a i - c h u 3 1 1 と p C A G G S - C 3 G を共にトランスフェクトした場合における R a i - c h u 3 1 1 の蛍光プロフィールであることを、r a p 1 G A P I I は p R a i - c h u 3 1 1 と p C A G G S - r a p 1 G A P I I を共にトランスフェクトした場合における R a i - c h u 3 1 1 の蛍光プロフィールであることを示す。

第 1 6 図は、プラスミド p R a i - c h u 1 5 8 の構造を示す。バックボーンとなるベクターの構造は第 3 図と同一である。

第17図は、プラスミドpRai-chu158の翻訳領域における塩基配列および予測されるアミノ酸配列を示す。

第18図は、プラスミドpRai-chu158の翻訳領域における塩基配列および予測されるアミノ酸配列（つづき）を示す。

第19図は、プラスミドpRai-chu158の翻訳領域における塩基配列および予測されるアミノ酸配列（つづき）を示す。

第20図は、発現タンパク質Rai-chu158の蛍光プロフィールを示す。HEK293T細胞にpRai-chu158とグアニンヌクレオチド交換因子Ca1DAG-GEFIII発現ベクター（pCAGGS-Ca1DAG-GEFIII；文献10に記載）あるいはGTP水解促進酵素Gap1m発現ベクター（pEF-Bos-Gap1m）をリン酸カルシウム法にてトランスフェクトし、48時間培養後に細胞を可溶化し、遠心分離後、上清を得た。該上清について励起波長433nmにて、波長450nm～550nmにおける蛍光強度を蛍光分光光度計にて測定した。第20図に示すグラフの右囲みにおけるGap1mはpRai-chu158とpEF-Bos-Gap1mを共にトランスフェクトした場合におけるRai-chu158の蛍光プロフィールであることを、Ca1DAG-GEFIIIはpRai-chu158とpCAGGS-Ca1DAG-GEFIIIを共にトランスフェクトした場合におけるRai-chu158の蛍光プロフィールであることを示す。

第21図は、プラスミドpRai-chu119の翻訳領域における塩基配列および予測されるアミノ酸配列を示す。

第22図は、プラスミドpRai-chu119の翻訳領域における塩基配列および予測されるアミノ酸配列（つづき）を示す。

第23図は、プラスミドpRai-chu119の翻訳領域における塩基配列および予測されるアミノ酸配列（つづき）を示す。

第24図は、発現タンパク質Rai-chu119の蛍光プロフィールを示す

。HEK 293 T細胞にpRai-chu119またはpRafra s1722とグアニンヌクレオチド交換因子Sos発現ベクター（pCAGGS-mSos）とをリン酸カルシウム法にてトランスフェクトし、24時間培養後に33℃および40℃に移し、さらに24時間培養を加えた後、細胞を可溶化し、遠心分離して上清を得た。該上清について励起波長433 nmにて、波長450 nm～550 nmにおける蛍光強度を蛍光分光光度計にて測定した。第21図に示すグラフの右囲みにおける対照はpRafra s1722とpCAGGS-mSosを共にトランスフェクトした場合におけるRai-chu119の蛍光プロフィールであることを、変異ありはpRai-chu119とpCAGGS-mSosを共にトランスフェクトした場合におけるRai-chu119の蛍光プロフィールであることを示す。Rai-chu119では野生型（Rafra s1722）より、グアニンヌクレオチド交換因子に対する反応性が増加していた。

第25図は、上皮細胞増殖因子（EGF）添加による細胞内におけるECFPおよびEYFPの蛍光強度の経時的変化の結果を示す。実施例1に記載の蛍光顕微鏡システムを用いて、波長430 nmの励起光を照射して蛍光波長475 nmおよび530 nmでの画像を経時的に取得し、当該画像からECFPおよびEYFPの蛍光強度を求めた。

発明を実施するための最良の形態

本発明の低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質（以下、モニタータンパク質という）は、GTP結合型の低分子量GTP結合タンパク質が特異的にその標的タンパク質のみに結合するという性質を利用したものであり、非侵襲的な低分子量GTP結合タンパク質の活性化の測定に非常に有用なタンパク質である。本発明のモニタータンパク質は、低分子量GTP結合タンパク質、該低分子量GTP結合タンパク質の標的タンパク質、GFPアクセプタータンパク質、およびGFPドナータンパク質からなる融合タンパク質であり、各タンパ

ク質が適切に、すなわち個々に本来のコンフォメーションを形成して各タンパク質が有する機能を完全な程度に発揮し得るような状態で、前記各タンパク質が直接または間接的に連結されてなる。従って、かかる融合タンパク質のアミノ酸配列は、前記各タンパク質のアミノ酸配列部分が直接または間接的に連結されてなる構造を有する。なお、本発明のモニタータンパク質を構成する各タンパク質は、当該タンパク質が有する機能を完全な程度に発揮し得るようであれば当該タンパク質の一部であってもよい。

本明細書においては、モニタータンパク質内に含まれる各タンパク質をいう場合、例えば、標的タンパク質を例にあげると、標的タンパク質そのものと区別し、標的タンパク質部分というべきところ、かかる区別なく、簡易に標的タンパク質と表現する。

本発明のモニタータンパク質では、低分子量GTP結合タンパク質のGTPとの結合による活性化（GDP結合型の、グアニンヌクレオチド交換因子によるGTP結合型への変換による低分子量GTP結合タンパク質の活性化を含む）に伴いモニタータンパク質内で低分子量GTP結合タンパク質とその標的タンパク質とが結合し、その結果、GFPドナータンパク質からGFPアクセプタータンパク質へのFRET効率に変化が生ずることになる。第2図に、本発明のモニタータンパク質の一例を模式的に示し、該モニタータンパク質を用いる、FRETを利用した低分子量GTP結合タンパク質の活性化を測定する方法の原理を示す。なお、本明細書においてFRET効率とは、GFPドナータンパク質に対する励起光を本発明のモニタータンパク質に照射した場合の、GFPドナータンパク質の蛍光波長における蛍光強度とGFPアクセプタータンパク質の蛍光波長における蛍光強度との比（蛍光強度比）をいう。詳しくは後述する。

FRETを実現するためには、i) GFPドナーの発光スペクトラムとGFPアクセプターの吸光スペクトラムとの重なり、ii) ドナーとアクセプター間の距離、iii) ドナーの発光モーメントとアクセプターの吸光モーメントの配向の3

因子を考慮しなければならない。また、GFPを他のタンパク質と融合する場合、他のタンパク質と融合することがストレスとなってGFPのミスフォールディングが生じ、その結果、発色団形成の効率が低下し、無蛍光のGFPとなる可能性をも考慮しなければならない。このように、GFPドナーとGFPアクセプターを利用して両者間にFRETの良好な発現を生じさせるには厳格な条件が存在し、未だ両者間の配置等に一定の規則も見出されておらず、FRETの実現は一般に困難である。すなわち、FRETの実現は公知の技術常識に基づき容易になし得るものではなく、期待し得る程度を超える試行錯誤や複雑高度の実験等を要するものである。本発明のモニタータンパク質は、前記タンパク質を、本発明の所望の効果が得られ得るように適切に組み合わせたものであり、GTP結合型の低分子量GTP結合タンパク質が特異的にその標的タンパク質のみに結合するという性質を利用し、GTPの低分子量GTP結合タンパク質への結合に応じて変化するGFPドナータンパク質とGFPアクセプタータンパク質との間で生ずるFRETを実現させたもので、その技術的価値は非常に大きい。

本発明のモニタータンパク質における各構成タンパク質の結合の順序は、低分子量GTP結合タンパク質の活性化前後におけるFRET効率の差（以下、単にFRET効率の差という）の増大を考慮して適宜選択され得る。低分子量GTP結合タンパク質の活性化前後におけるFRET効率の差が大きい程、当該タンパク質の活性化状態をよりの確に捉えることができ、従って、低分子量GTP結合タンパク質の活性化の測定精度を向上させることができるので好ましい。該モニタータンパク質における低分子量GTP結合タンパク質と該低分子量GTP結合タンパク質の標的タンパク質との結合の好ましい態様としては、アミノ末端側に存在する低分子量GTP結合タンパク質の標的タンパク質結合部位のカルボキシル末端が、カルボキシル末端側に存在する標的タンパク質のアミノ末端に直接または間接的に結合される態様（1）、アミノ末端側に存在する標的タンパク質のカルボキシル末端が、カルボキシル末端側に存在する低分子量GTP結合タンバ

ク質の標的タンパク質結合部位のアミノ末端に直接または間接的に結合される態様（２）が挙げられ、態様（１）がより好ましい。GFPアクセプタータンパク質およびGFPドナータンパク質は各々、それらのアミノ末端またはカルボキシル末端が低分子量GTP結合タンパク質と標的タンパク質とが連結されたもの（連結物）のアミノ末端またはカルボキシル末端に直接または間接的に連結されて連結される。中でも、前記連結物のアミノ末端にGFPアクセプタータンパク質のカルボキシル末端が、カルボキシル末端にGFPドナータンパク質のアミノ末端が直接または間接的に連結されてなるモニタータンパク質が好ましい。従って、本発明のモニタータンパク質としては、該モニタータンパク質において、アミノ末端側より、GFPアクセプタータンパク質、低分子量GTP結合タンパク質、該低分子量GTP結合タンパク質の標的タンパク質、GFPドナータンパク質となるようにそれぞれ直接または間接的に連結されてなるものが特に好ましい。なお、「間接的に連結」とは、各タンパク質間の連結を、たとえば、後述するスペーサーとしてのペプチド等を介して行う態様をいう。

本発明のモニタータンパク質の構成要素である低分子量GTP結合タンパク質としては、当該タンパク質として知られるものであれば特に限定されるものではないが、有用性の観点からRasスーパーファミリーに属するものが好ましく、中でもRasファミリーに属するものがより好ましい。より詳しくは、H-Ras、K-Ras、N-Ras、R-Ras、Rap1A、Rap1B、Rap2A、およびRap2Bからなる群より選ばれる１種が好ましい。

一方、前記低分子量GTP結合タンパク質の標的タンパク質は、前記例示するような各低分子量GTP結合タンパク質がGTP結合型となった際に特異的に結合するものであれば特に限定されるものではない。有用性の観点から、好ましくはRafまたはRalGDSである。

さらに、前記低分子量GTP結合タンパク質と前記標的タンパク質の組み合わせとしては、有用性ならびに特異性の観点から、低分子量GTP結合タンパク質

がH-R a sであり、標的タンパク質がR a fである組み合わせ、または低分子量GTP結合タンパク質がR a p 1 Aであり、標的タンパク質がR a 1 G D Sである組み合わせが特に好ましい。

また、GFPアクセプタータンパク質としては前記例示したGFP関連タンパク質のいずれを使用することもできるが、機能的観点から、好ましくはEGFPまたはEYFPである。一方のGFPドナータンパク質も同様に前記例示したGFP関連タンパク質のいずれを使用することもできるが、機能的観点から、好ましくはECFPまたはEBFPである。

前記した本発明のモニタータンパク質の構成要素それぞれの特に好ましい組み合わせとしては、有効性、特異性および感度の観点から、低分子量GTP結合タンパク質がH-R a sであり、標的タンパク質がR a fであり、GFPドナータンパク質がECFPであり、GFPアクセプタータンパク質がEYFPであるか、または、低分子量GTP結合タンパク質がR a p 1 Aであり、標的タンパク質がR a 1 G D Sであり、GFPドナータンパク質がECFPであり、GFPアクセプタータンパク質がEYFPである。

また、低分子量GTP結合タンパク質、標的タンパク質、GFPドナータンパク質、およびGFPアクセプタータンパク質の結合の順序は、FRET効率の差の増大の観点から、本発明のモニタータンパク質において、好ましくはアミノ末端側よりEYFP-H-R a s-R a f-ECFPまたはEYFP-R a p 1 A-R a 1 G D S-ECFPが挙げられる。また、これらにおいてEYFPとECFPとが互いに交換されてなるものも好適に使用できる。

低分子量GTP結合タンパク質は、その標的タンパク質に結合することができれば該タンパク質の一部でもよく、必ずしも、その全部（全長）である必要はない。ここで、低分子量GTP結合タンパク質の一部とは、たとえば、公知の方法に従って当該タンパク質分子を大腸菌で生産し、試験管内でGTPと結合せしめるという方法により、標的タンパク質との結合が検出され得るタンパク質部分を

いう。なお、検出は、たとえば、標的タンパク質に対する抗体で免疫沈澱させ、GTP結合タンパク質の一部が共沈するかをイムノブロッティングで調べる方法により行うことができる。たとえば、H-RasおよびRap1Aであれば、好ましくは1～180位、より好ましくは1～172位に相当するアミノ酸配列部分からなるタンパク質部分を、R-Rasであれば、好ましくは1～204位、より好ましくは28～204位に相当するアミノ酸配列部分からなるタンパク質部分を挙げることができる。

一方、低分子量GTP結合タンパク質の全部よりはむしろ、そのアミノ酸配列のアミノ末端あるいはカルボキシル末端を一部削ることではしばしばFRET効率の差の増大が生ずる。それゆえ、当該タンパク質の一部としては、そのアミノ酸配列のアミノ末端領域および／またはカルボキシル末端領域に、好ましくは少なくとも1個、より好ましくは1～28個、さらに好ましくは17～28個のアミノ酸の欠損を有してなるものも含まれる。なお、かかる領域におけるアミノ酸の欠損部位には特に限定はない。たとえば、H-Rasの場合、C末端を172位まで削ったものが180位まで削ったものよりFRET効率の差を増大させた。すなわち、そのアミノ酸配列のカルボキシル末端領域において好ましくは少なくとも1個、より好ましくは9～20個、さらに好ましくは17個のアミノ酸の欠損を有してなるものが好ましい。また、R-Rasの場合、アミノ末端から28個のアミノ酸を削ったものが削らないものよりもFRET効率の差を増大させた。すなわち、そのアミノ酸配列のアミノ末端領域において好ましくは少なくとも1個、より好ましくは1～28個、さらに好ましくは28個のアミノ酸の欠損を有してなるものが好ましい。

なお、前記アミノ末端領域またはカルボキシル末端領域とは、低分子量GTP結合タンパク質のアミノ酸配列において、そのアミノ末端またはカルボキシル末端から、アミノ酸の個数で好ましくは30個までの領域をいう。

また、標的タンパク質も、対応する低分子量GTP結合タンパク質に結合する

ことができれば該タンパク質の一部でもよく、必ずしも、その全部（全長）である必要はない。ここで、標的タンパク質の一部とは、前記低分子量GTP結合タンパク質と同様の方法において、その対応する低分子量GTP結合タンパク質との結合が検出され得るタンパク質部分をいう。たとえば、Raf（GenBank/EMBL アccession番号：X03484）であれば、好ましくはRas結合領域（RBD）、詳しくは、好ましくは51～204位、より好ましくは51～131位に相当するアミノ酸配列部分からなるタンパク質部分を、RalGDS（GenBank/EMBL アccession番号：U14417）であれば、好ましくは202～309位、より好ましくは211～297位に相当するアミノ酸配列部分からなるタンパク質部分を挙げることができる。

一方、GFPドナータンパク質および／またはGFPアクセプタータンパク質も、FRETのペアーとなる機能が保たれていればそれらタンパク質の一部でもよく、必ずしも全部（全長）である必要はない。しばしば、それらのアミノ酸配列のカルボキシル末端を短くすることにより、FRET効率の差の増大が生ずる。たとえば、GFPアクセプタータンパク質および／またはGFPドナータンパク質の一部としては、それらのアミノ酸配列のカルボキシル末端領域に好ましくは少なくとも1個、より好ましくは1～11個の欠損を有してなるものを挙げることができる。なお、かかる領域におけるアミノ酸の欠損部位には特に限定はない。たとえば、EYFPの場合、そのアミノ酸配列のカルボキシル末端領域において好ましくは少なくとも1個、より好ましくは1～11個、さらに好ましくは11個のアミノ酸の欠損を有してなるものが好ましい。また、ECFPの場合、そのアミノ酸配列のカルボキシル末端領域において好ましくは少なくとも1個、より好ましくは1～11個、さらに好ましくは11個のアミノ酸の欠損を有してなるものが好ましい。ここで、カルボキシル末端領域とは、本発明に使用するGFP関連タンパク質のアミノ酸配列において、そのカルボキシル末端から、アミノ酸の個数で好ましくは1～20個までの、より好ましくは11個までの領域を

いう。なお、FRETのペアとなる機能が保たれているか否かは、たとえば、公知の方法に従いFRETのペアを形成すると想定される1対のタンパク質分子を共に大腸菌で生産し、当該1対のタンパク質を含む細胞抽出液において、当該タンパク質それぞれの想定される励起波長での蛍光強度を観察するという方法により評価することができる。

さらに、GFPアクセプタータンパク質および／またはGFPドナータンパク質は変異を有していてもかまわない。かかる変異の導入は、FRETのペアとなる機能が保たれている限り、GFPアクセプタータンパク質および／またはGFPドナータンパク質のアミノ酸配列における任意の部位に対し行うことができる。たとえば、変異の態様としては複数のアミノ酸の置換が挙げられ、かかるアミノ酸置換の具体的態様としては、たとえば、Phe 64 Leu、Val 68 Leu、Ser 72 Ala、Ile 167 Thrなどが挙げられる。このような変異を導入することで発色団形成効率の上昇や、FRET効率の上昇などの効果が得られるので好ましい。変異の導入は、公知の制限酵素を用いる方法や、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）を用いる方法により行うことができる。

また、低分子量GTP結合タンパク質および／またはその標的タンパク質に変異を導入したのもも本発明において好適に使用することができる。例えば点突然変異を導入することにより、グアニンヌクレオチド交換因子やGTPアーゼ活性化因子に対する感受性を向上させたものを得ることができる。かかる変異の導入は、互いに結合する機能が保たれている限り、低分子量GTP結合タンパク質および／またはその標的タンパク質のアミノ酸配列における任意の部位に対し行うことができる。たとえば、変異の態様としてはアミノ酸の置換、挿入、欠失などが挙げられ、具体的には、たとえば、H-Rasのアミノ酸配列においてIle 36をLeuに変化させる態様が挙げられる。かかるH-Rasにおける変異により、当該H-Rasは、多数の変異の中でもGTPアーゼ活性化因子に対し最も高い感受性を示すようになる。その結果、モニタータンパク質のダイナミック

レンジを変化させることができる。かかる変異を有するH-R a sは、本発明のモニタータンパク質において好適に使用することができる。なお、変異の導入は、公知の制限酵素を用いる方法や、PCRを用いる方法により行うことができる。

本発明のモニタータンパク質においては、構成要素である各タンパク質の空間的な配置は、その機能発現に関連する因子である。かかる配置を変化させることによりFRET効率の差を非常に増大させることができる。たとえば、モニタータンパク質における各構成タンパク質間にスペーサーとなるペプチド配列を入れ、FRET効率の差を調節することができる。かかるスペーサーは、FRET効率の差を増大させる観点から、低分子量GTP結合タンパク質と標的タンパク質との間に挿入することが好ましい。スペーサーとなるペプチド配列としては、好ましくは1～30個、より好ましくは1～10個の連続した任意のアミノ酸からなるペプチドを挙げることができる。かかるペプチドを低分子量GTP結合タンパク質と標的タンパク質との間に挿入した場合、FRET効率の差が増大すること、GFP関連タンパク質自身の折りたたみの効率が上昇することなどが期待できる。また、各構成タンパク質が、本発明のモニタータンパク質内において適切なコンフォメーションをとり得る観点から、好ましくはグリシンを主とする低分子で二次構造を形成しにくいという性質を有するアミノ酸からなるペプチドをスペーサーとして用いることが好ましい。

また、本発明のモニタータンパク質のアミノ酸配列のアミノ末端および／またはカルボキシル末端に他のタンパク質あるいはペプチドを融合することも好ましい態様の1つである。特に、該モニタータンパク質に、細胞内局在シグナル、たとえば、公知の小胞体（ER）移行シグナル、細胞膜局在シグナルなどを付加することにより、細胞内の局所でのGTP結合タンパク質の活性化を直接測定することが可能となり好ましい。また、後述するように、細胞内の局所でのGTP結合タンパク質のGTP結合型とGDP結合型の量比（GTP/GDP比）（モル

比)を直接測定することも可能となり好ましい。

本発明のモニタータンパク質では、GTPが結合し低分子量GTP結合タンパク質が活性化された場合、該モニタータンパク質内で低分子量GTP結合タンパク質と標的タンパク質との結合が誘導され全体のコンフォメーションが変化することになり、GFPアクセプタータンパク質とGFPドナータンパク質との距離と方向とが変化する。次いで、特定の波長の光を照射すると、かかるアクセプタータンパク質とドナータンパク質との間でFRET効率の増加が検出されるようになる(第2図)。このようなFRET効率の変化には、前記モニタータンパク質のコンフォメーション変化後におけるGFPアクセプタータンパク質とGFPドナータンパク質の配置が影響する。たとえば、GFPドナータンパク質とGFPアクセプタータンパク質との距離が短くなるとFRET効率は増加し、距離が長くなるとFRET効率は減少する。FRET効率の変化の幅、すなわち、FRET効率の差の増減は、たとえば、用いる各構成タンパク質の性質により、スペーサーペプチド等の挿入により、所望により適宜調節することができる。

なお、上述する本発明のモニタータンパク質が本発明の所望の効果を発現し得るか否かについての評価は、たとえば、後述の実施例1に記載の方法に準じて評価することができる。

本発明はまた、本発明のモニタータンパク質をコードする遺伝子を提供する。かかる遺伝子は、該タンパク質の前記各構成タンパク質の遺伝子情報をGenBank等から入手し、公知のPCRを用いた方法により、あるいは制限酵素とリガーゼとを用いた方法により常法に従って作製することができる。

本発明のモニタータンパク質の構成タンパク質として好適に用いられる各タンパク質のGenBank/EMBLにおけるアクセッション番号を以下に示す。なお、アクセッション番号は各タンパク質名の後の括弧内に示す。

(1) 低分子量GTP結合タンパク質

H-Ras (V00574)、K-Ras (L00045~L00049)、N-Ras (L00040~

L00043)、R-R a s (M14948,M14949)、R a p 1 A (X12533)、R a p 1 B (X08004)、R a p 2 A (X12534)、R a p 2 B (X52987)

(2) 標的タンパク質

R a f (X03484)、R a 1 G D S (U14417)

(3) G F P ドナータンパク質とG F P アクセプタータンパク質

E G F P (U76561)、E Y F P (AVU73901 1)、E C F P (AB041904)

なお、E B F P (G F P に以下の3つの変異を有するものである:P h e 6 4 L e u、T y r 6 6 H i s、T y r 1 4 5 P h e) については文献6に記載されている。

本発明はさらに、前記遺伝子を含む発現ベクターを提供する。かかるベクターは、公知の方法に従い、本発明のモニタータンパク質をコードする遺伝子を公知の原核細胞発現ベクター、例えばp G E X - 2 T (アマシャム-ファルマシア バイオテック社製)、真核細胞発現ベクター、例えばp C A G G S (文献7)に、あるいはウイルスベクター、例えばp S h u t t l e (C L O N T E C H 社製)に挿入することにより得ることができる。発現ベクターとしては発現プラスミドが好ましい。

本発明はさらに、前記発現ベクターを保持する形質転換された細胞およびトランスジェニック動物を提供する。かかる細胞は、前記発現ベクターを対象とする細胞に導入することにより得られる。細胞への導入法としては公知のトランスフェクション法やウイルス感染法が使用でき特に制限はないが、たとえばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、あるいはエレクトロポレーション法等が使用できる。該細胞としては真核細胞あるいは原核細胞を用いることができ、特に制限はない。たとえば、真核細胞としては、ヒト胎児腎臓由来H E K 2 9 3 T細胞、サル腎臓由来C O S細胞、ヒト臍帯由来H U V E C細胞、酵母など、原核細胞としては、大腸菌など、培養細胞や、その他、各種細胞を使用できる。一方、前記発現ベクターを公知の方法、たとえば、マウス受精卵の核内にプラスミドDN

Aをマイクロインジェクションする方法などにより、マウス等の個体に直接導入することでトランスジェニック動物を得ることができる。

本発明においてはさらに、本発明のモニタータンパク質を用いる低分子量GTP結合タンパク質の活性化を測定する方法を提供する。かかる方法によれば、本発明のモニタータンパク質におけるFRETを検出することで低分子量GTP結合タンパク質の活性化を測定することができる。また、前記する本発明の形質転換された細胞またはトランスジェニック動物においてFRETを検出し、当該細胞または動物における低分子量GTP結合タンパク質の活性化を直接測定することもできる。かかる場合、別途、GTPの結合した低分子量GTP結合タンパク質とGTPからの無機リン酸の遊離によって生じるGDPの結合した低分子量GTP結合タンパク質とを測定してGTP/GDP比〔またはGTP/(GDP+GTP)比〕(いずれもモル比)を算出し、さらに対応するFRET効率を測定して予め検量線を作成しておけば、当該細胞または動物におけるFRET効率に基づいて、GTP/GDP比を算出することができる。

たとえば、具体的には以下のような方法が例示される。

(1) 分光光度計を用いた測定法

モニタータンパク質を発現し得る本発明の形質転換細胞を、当該タンパク質の発現が可能な条件下に培養する。次いで、当該細胞を可溶化する。細胞の可溶化の方法に特に制限はないが、界面活性剤TritonX100を含む溶液を用いて可溶化する方法が好ましい。可溶化した溶液に、GFPドナータンパク質に対する励起光(たとえば、波長433nm)を照射し、たとえば、波長450nmから550nmの範囲で蛍光プロフィールを公知の蛍光分光光度計を用いて測定する。得られた蛍光プロフィールのデータを基に、たとえば、波長475nmにおけるGFPドナータンパク質の蛍光強度と波長530nmにおけるGFPアクセプタータンパク質の蛍光強度との比〔(波長530nmにおける蛍光強度)/(波長475nmにおける蛍光強度)〕を算出し、それをGFPドナータンパク質からGFP

Pアクセプタータンパク質へのFRET効率とする。GTPの低分子量GTP結合タンパク質への結合前に比べ、結合後（すなわち、低分子量GTP結合タンパク質の活性化後）にFRET効率が上昇するため、それを指標として低分子量GTP結合タンパク質の活性化を測定する。なお、低分子量GTP結合タンパク質の活性化と不活性化は、たとえば、前者については、グアニンヌクレオチド交換因子Sos発現ベクター（pCAGGS-mSos；文献9に記載）を本発明のモニタータンパク質を発現し得る細胞にトランスフェクトすることにより、また、上皮細胞増殖因子（EGF）による当該細胞の刺激により行うことが、後者については、たとえば、GTP水解促進酵素Gap1m発現ベクター（pEF-Bos-Gap1m；文献9に記載）を当該細胞にトランスフェクトすることにより行うことができる。一方、FRET効率はGFPドナータンパク質とGFPアクセプタータンパク質との距離および方向の変化により生ずるため、FRET効率の変化によりモニタータンパク質の構造変化をも検出することができる。

（2）顕微鏡を用いた測定法

モニタータンパク質を発現した本発明の形質転換細胞またはトランスジェニック動物を蛍光顕微鏡で観察し、低分子量GTP結合タンパク質の活性化前後に生ずるFRET効率の変化を直接的に検出する。なお、低分子量GTP結合タンパク質の活性化と不活性化は前記（1）分光光度計を用いた測定法の場合と同様にして行うことができる。

用いる蛍光顕微鏡には特に制限はないが、公知のキセノン光源を有する倒立型蛍光顕微鏡（Carl Zeiss, Axiovert 100）に回転式蛍光励起フィルターおよび回転式蛍光発光フィルターを備え、高感度冷却CCDカメラを備えたものが好ましい。さらにフィルターおよびカメラ画像は、日本ローパー社製Metamorph 画像解析ソフトにて制御ならびに解析できるシステムが望ましい。

前記細胞または動物にGFPドナータンパク質の励起光を照射し、GFPドナータンパク質の蛍光波長での画像をCCDカメラにより撮影し、その後、GFP

アクセプタータンパク質の蛍光波長での画像を撮影する。両画像の蛍光強度の比を測定することにより各測定点でのFRET効率を算出できる。また、たとえば、グアニンヌクレオチド交換因子Sos発現ベクターをモニタータンパク質を発現し得る細胞または動物に種々の量で導入して低分子量GTP結合タンパク質の種々の活性化状態（すなわち、活性化の程度が異なる状態）を構築する。次いで、各状態における細胞または動物を蛍光顕微鏡で観察し、前記と同様にしてFRET効率を求める。また、各状態における細胞（当該動物から得られた、FRET効率を求めた部位に由来する細胞を含む）を可溶化し、別途、GTPの結合した低分子量GTP結合タンパク質とGDPの結合した低分子量GTP結合タンパク質とを測定してGTP/GDP比を算出する。詳しくは、公知の方法（文献2）により低分子量GTP結合タンパク質へのGTP結合量およびGDP結合量を測定してGTP/GDP比を求める。次いで、得られたGTP/GDP比を、予め求めておいたFRET効率と関連付ける。すなわち、各状態での測定時点におけるFRET効率とGTP/GDP比を測定し、それらを基に検量線を作成する。このようにして別途、検量線を作成しておけば、モニタータンパク質を発現した細胞または動物におけるFRET効率を蛍光顕微鏡を用いて直接測定するだけで、各測定時点でのFRET効率からGTP/GDP比を求めることが可能となる。従って、非侵襲的に細胞内または個体内における低分子量GTP結合タンパク質の活性化状態を容易に把握することができ、しかも、かかる状態におけるGTP/GDP比を具体的に得ることができる。なお、かかる検量線を用いる方法は、前記（1）の方法においても同様に使用することができる。

本発明によれば、非侵襲的な低分子量GTP結合タンパク質の活性化の測定を可能にする低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質、その遺伝子等が提供される。また、かかるモニタータンパク質を発現し、非侵襲的な低分子量GTP結合タンパク質の活性化の測定に有用な前記発現ベクターを保持する形質転換された細胞およびトランスジェニック動物、ならびに前記タンパク質を

用いる低分子量GTP結合タンパク質の活性化を測定する方法が提供される。従って、低分子量GTP結合タンパク質の活性化状態を細胞内または個体内で非侵襲的に知ることが可能となり、生命現象の理解のみならず、薬剤開発（たとえば、癌、自己免疫疾患、アレルギー性疾患等の治療剤または予防剤）において多大な利益をもたらし得る。

参照文献

以下に、本明細書において記載する参照文献を列挙する。かかる参照文献は参照により、その全教示が本明細書中に取り込まれる。なお、本明細書中では〔文献（数字）〕として参照する各文献の文献番号を示す。

1. Bos, J. L. 1997. 「Ras様GTPアーゼ (Ras-like GTPases.)」 *Biochim. Biophys. Acta* 1333:M19-M31.
2. Satoh, T. and Y. Kaziro. 1995. 「刺激された造血細胞におけるRas結合グアニンヌクレオチドの測定 (Measurement of Ras-bound guanine nucleotide in stimulated hematopoietic cells.)」 *Method. Enzymol.* 255:149-155.
3. Franke, B., J. W. N. Akkerman, and J. L. Bos. 1997. 「ヒト血小板における迅速なRap1のCa²⁺媒介活性化 (Rapid Ca²⁺-mediated activation of Rap1 in human platelets.)」 *EMBO J.* 15:252-259.
4. Tsien, R. Y. and A. Miyawaki. 1998. 「生細胞の機構を見る (Seeing the machinery of live cells.)」 *Science* 280:1954-1955.
5. Pollok, B. A. and R. Heim. 1999. 「FRETに基づく応用におけるGFPの使用 (Using GFP in FRET-based applications.)」 *Trends Cell Biol.* 9: 57-60.
6. Miyawaki, A., J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, and R. Y. Tsien. 1997. 「グリーンフルオレセントプロテインとカルモジュリンに基づくCa²⁺の蛍光インディケーター (Fluorescent indicators for

Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin) Nature 388:882-887.

7. Niwa, H., K. Yamamura, and J. Miyazaki. 1991. 「新規真核細胞ベクターによる高発現形質転換体の効率的な選抜 (Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector.)」 Gene 108:193-200.

8. DeClue, J. E., J. C. Stone, R. A. Blanchard, A. G. Papageorge, P. Martin, K. Zhang, and D. R. Lowy. 「細胞の形質転換のための温度感受性の ras エフェクタードメイン変異体: GTPアーゼ活性化タンパク質とNF-1との相互作用 (A ras effector domain mutant which is temperature sensitive for cellular transformation: interactions with GTPase-activating protein and NF-1.)」 Mol. Cell Biol. 11:3132-3138, 1991.

9. Ohba, Y., N. Mochizuki, S. Yamashita, A. M. Chan, J. W. Schrader, S. Hattori, K. Nagashima, and M. Matsuda. 「R-Ras、TC-21/R-Ras2、M-Ras/R-Ras3の制御タンパク質 (Regulatory proteins of R-Ras, TC-21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3.)」 J. Biol. Chem. 275:20020-20026, 2000.

10. Yamashita, S., N. Mochizuki, Y. Ohba, M. Tobiume, Y. Okada, H. Sawa, K. Nagashima, and M. Matsuda. 「Ga1DAG-GEFIIIによるRas、R-Ras、Rap1の活性化 (Ga1DAG-GEFIII activation of Ras, R-Ras, and Rap1.)」 J. Biol. Chem. 275:25488-25493, 2000.

実施例

以下、本発明を実施例により説明するが、本発明の範囲はかかる実施例のみに限定されるものではない。なお、以下においては、ヒトH-RasをRasと、ヒトc-Raf1をRafと、ヒトRap1AをRap1Aと、ヒトRalGD

SをR a 1 G D Sと、ヒトR-R a sをR-R a sという。

実施例1 R a f r a s 1 7 2 2によるR a s活性化の測定

(1) R a sとR a fをコードするキメラ遺伝子の作成

(i) R a s遺伝子の増幅

R a sのc D N A (Genbank/EMBL アクセッション番号: V00574) を鋳型として、センスプライマーh R a s X h (5'-CTCGAGATGACGGAATATAAGCTGGTGGTG-3') (配列番号: 1) およびアンチセンスプライマーR a s 1 7 2 R a f (5'-AGTGTTCCTTGCTTGAAGGGGTACCACTCCGGAGCCGTTTCAGCTTCCGCAGCTTGTG-3') (配列番号: 2) と、耐熱性DNA複製酵素P f x (Gibco-BRL, Bethesda, U.S.A.) とを用い、P C R (ポリメラーゼ連鎖反応) 法によりR a sの1位から172位のアミノ酸配列に対応するc D N A部分を増幅した。

センスプライマーh R a s X hは、5'末端の下線で示した制限酵素X h o Iの切断部位の塩基配列とR a sの1位から8位のアミノ酸配列に対応するc D N A部分の塩基配列とからなる。一方、アンチセンスプライマーR a s 1 7 2 R a fは、5'末端より、R a fのR a s結合領域のアミノ酸配列のアミノ末端領域(61位から67位まで)に対応するc D N A部分の相補鎖の塩基配列、スパー一配列(下線部)、R a sの166位から172位のアミノ酸配列に対応するc D N A部分の相補鎖の塩基配列とからなる。

(ii) R a f遺伝子の増幅

R a fのc D N A (Genbank/EMBL アクセッション番号: X03484) を鋳型として、センスプライマーR a f R B D - F 1 (5'-GGTACCCCTTCTAAGACAAGCAACACT-3') (配列番号: 3) およびアンチセンスプライマーR a f R B D n 2 (5'-GCGGCCGCCCAGGAAATCTACTTGAAGTTC-3') (配列番号: 4) と前記P f xとを用い、P C R法によりR a fの51位から131位のアミノ酸配列に対応するc D N A部分を増幅した。

センスプライマーR a f R B D - F 1は、5'末端の下線で示した制限酵素K p n Iの切断部位の塩基配列とR a fの51位から57位のアミノ酸配列に対応するc D N A部分の塩基配列とからなる。一方、アンチセンスプライマーR a f R B D n 2は、5'末端の下線で示した制限酵素N o t Iの切断部位の塩基配列とR a fのR a s結合領域のアミノ酸配列のカルボキシル末端領域(125位から131位まで)に対応するc D N A部分の相補鎖の塩基配列とからなる。

(iii) R a sとR a fをコードするキメラ遺伝子の増幅

前記(i)および(ii)で増幅された遺伝子を混合したものを鋳型として、センスプライマーh R a s X hおよびアンチセンスプライマーR a f R B D n 2と前記P f xとを用い、P C R法によりR a sとR a fをコードするキメラ遺伝子からなるc D N Aを増幅した。次いで、得られたDNA断片をp C R - b l u n t I I - T O P O (Invitrogen社)にライゲーションし、得られたプラスミド構築物で大腸菌を形質転換した。かかる大腸菌を培養後、公知のアルカリS D S法によりプラスミドを精製した。

(2) E Y F PおよびE C F Pを発現するベクターp F r e t 2の構築

(i) p C A G G S - P 7の構築

p B l u e s c r i p t - S K I I (+) (Stratagene社)のマルチプルクロニングサイトをプライマーP 7 (5'-CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3') (配列番号: 5)とプライマーP 8 (5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGAAAC-3') (配列番号: 6)とを用い、前記と同様にしてP C R法により増幅し、DNA断片を得た。

一方、哺乳類細胞発現ベクターp C A G G S (文献7)をE c o R Iで切断し、K l e n o w酵素で平滑末端化処理した。次いで、前記DNA断片と前記処理後のp C A G G SとをT 4 DNAリガーゼで結合した。得られたベクターをp C A G G S - P 7と呼ぶ。

(ii) E Y F P遺伝子の増幅

本実施例においては、公知のE Y F P (Genbank/EMBL アクセッション番号: AVU73901

1) を用いた。このEYFPのcDNAを鋳型として、センスプライマーGFP-N2 (5'-GGATCCGGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3') (配列番号: 7) およびアンチセンスプライマーGFP-N3 (5'-GGATCCGGTACCTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCATG-3') (配列番号: 8) と前記Pfxとを用い、PCR法によりEYFPの全長アミノ酸配列に対応するcDNAを増幅した。

センスプライマーGFP-N2は、5'末端の下線で示した制限酵素BamHIの切断部位の塩基配列と3塩基のスペーサーとEYFPの1位から7位のアミノ酸配列に対応するcDNA部分の塩基配列とからなる。一方、アンチセンスプライマーGFP-N3は、5'末端の下線で示した制限酵素BamHI、KpnIおよびXhoIの各々の切断部位の塩基配列と後述のECFPのアミノ酸配列のカルボキシル末端領域(233位から239位まで)に対応するcDNA部分の相補鎖の塩基配列とからなる。

(iii) ECFP遺伝子の増幅

本実施例においては、EGFP (Genbank/EMBL アccession番号: U76561) に対し、PCR法を用いる公知の方法により4つのアミノ酸置換(Tyr66Trp; Asn146Ile; Met153Thr; Val163Ala)を導入したものをECFPとして用いた。このECFPのcDNAを鋳型として、センスプライマーXFPN2 (5'-GCGGCCGCATG GTGAGCAAGGGCGAGGAGC-3') (配列番号: 9) およびアンチセンスプライマーXF-P-Bg1 (5'-AGATCTACAGCTCGTCCATGCCGAGAG-3') (配列番号: 10) と前記Pfxとを用い、PCR法によりECFPの全長アミノ酸配列に対応するcDNAを増幅した。

センスプライマーXFPN2は、5'末端の下線で示した制限酵素NotIの切断部位の塩基配列とECFPの1位から8位のアミノ酸配列に対応するcDNA部分の塩基配列とからなる。一方、アンチセンスプライマーXF-P-Bg1は、5'末端の下線で示した制限酵素Bg1IIの切断部位の塩基配列とECFPのアミノ酸配列のカルボキシル末端領域(231位から237位まで)に対

応する cDNA 部分の相補鎖の塩基配列とからなる。

(iv) pFret 2 の構築

前記 (i) で得られた pCAGGS-P7 を制限酵素 Xho I で切断し、dTTP と dCTP の存在下に Klenow 酵素で処理した。また、前記 (ii) で得られた EYFP の DNA 断片を BamHI で切断し、次いで dGTP と dATP の存在下に Klenow 酵素で処理した。得られた二つの遺伝子断片を T4 DNA リガーゼで結合し、プラスミドを得た。該プラスミドを Not I と Bgl II で切断し、次いで、Not I と Bgl II で予め切断しておいた前記 (iii) で得られた ECFP の DNA 断片と、T4 DNA リガーゼを用いて結合した。得られたプラスミドを pFret 2 と命名した。

(3) Ras 活性モニタータンパク質遺伝子の発現プラスミドである pRaf ras 1722 の構築

前記 (2) - (iv) で得られた pFret 2 を Xho I と Not I で切断し、次いで、Xho I と Not I で予め切断しておいた前記 (1) - (iii) で得られたキメラ遺伝子と、T4 DNA リガーゼを用いて結合した。得られたプラスミドを pRaf ras 1722 と呼ぶ。pRaf ras 1722 の構造、その翻訳領域の塩基配列 (配列番号: 11) および予測されるアミノ酸配列 (配列番号: 12) を第 3 図と第 4 図～第 6 図にそれぞれ示す。

かかる塩基配列および予測されるアミノ酸配列を説明する:

nt 1 - 717 : オワンクラゲ (Aequorea) の EYFP

nt 718 - 723 : リンカー

nt 724 - 1239 : Ras

nt 1240 - 125 : リンカー

nt 1258 - 1500 : Raf

nt 1501 - 1509 : リンカー

nt 1510 - 2220 : オワンクラゲの ECFP

(4) 哺乳類細胞でのR a s 活性モニタータンパク質 (R a f r a s 1 7 2 2) の発現と分光光度法による解析

ヒト胎児腎臓由来H E K 2 9 3 T細胞は1 0 %ウシ胎仔血清を含むD M E M 培地 (日本製薬社製) で培養した。該H E K 2 9 3 T細胞に前記 (3) で得られた p R a f r a s 1 7 2 2 とグアニンヌクレオチド交換因子S o s 発現ベクター (p C A G G S - m S o s) またはG T P 水解促進酵素G a p 1 m 発現ベクター (p E F - B o s - G a p 1 m) をリン酸カルシウム法にてトランスフェクトした。トランスフェクト後のH E K 2 9 3 T細胞を1 0 %ウシ胎仔血清を含むD M E M 培地 (日本製薬社製) で培養し、R a s 活性モニタータンパク質を発現させた。4 8 時間培養後に、細胞をリン酸緩衝生理食塩水にて洗浄し、溶解液 (20 m M Tris-HCl, pH 7.5, 150 m M NaCl, 5 m M MgCl₂, 0.1% Triton X-100) にて溶解した。得られた細胞溶解液を1 0, 0 0 0 × g で遠心分離後、上清を回収した。

該上清を蛍光分光光度計 (日本分光社製、FP-750) の1 m l キュベットに入れ、励起波長4 3 3 n m にて、4 5 0 n m から5 5 0 n m までの蛍光強度を測定した。得られた蛍光プロフィールを第7図に示す。

なお、前記トランスフェクト後のH E K 2 9 3 T細胞を³²P i 無機リン酸で標識した後に該細胞の溶解液を得、抗G F P 抗体を用い、発現させたR a s 活性モニタータンパク質を免疫沈降し、結合しているG T P およびG D P を薄層クロマトグラフィーにて分離することにより、R a s 活性モニタータンパク質について得られた蛍光プロフィールのデータから得られるF R E T 効率 (波長4 3 3 n m で励起したときの、(波長5 3 0 n m における蛍光強度) を (波長4 7 5 n m における蛍光強度) で割った値) と実際のG T P 結合の程度とを対応付けることが可能である (第8図)。なお、第8図中、F R E T 効率は「蛍光強度比 (波長5 3 0 / 4 7 5)」と、G T P 結合の程度は「G T P / (G D P + G T P) (%)」として示した。

(5) 哺乳類細胞でのR a s 活性モニタータンパク質の発現とタイムラプス蛍光

顕微鏡による解析

サル腎臓由来COS7細胞は10%ウシ胎仔血清を含むフェノールレッド不含MEM培地（日本製薬社製）で培養した。該COS7細胞に前記（3）で得られたpRaf ras 1722をリン酸カルシウム法にてトランスフェクトした。トランスフェクト後のCOS7細胞を10%ウシ胎仔血清を含むフェノールレッド不含MEM培地（日本製薬社製）で培養し、Ras活性モニタータンパク質を発現させた。トランスフェクションの48時間後に、培養細胞をタイムラプス蛍光顕微鏡による観察に供した。

かかる顕微鏡は、回転式蛍光励起フィルター装置および回転式蛍光発光フィルター装置（LUDL electronic 社製）を備え、さらに高感度冷却CCDカメラ（Photometrix 社製、Micromax450）を備えた、キセノン光源を有する倒立型蛍光顕微鏡（Carl Zeiss社製、Axiovert 100）であり、観察の際は、該顕微鏡の制御ならびに観察結果の解析を日本ローパー社製メタモルフ（Metamorph）画像解析ソフトにより行うシステムを用いた。蛍光励起フィルター、蛍光発光フィルター、ダイクロイックミラーはオメガ社より購入した。

前記培養細胞に433nmの励起光を照射し、475nmのECFPドナーの蛍光波長での画像をCCDカメラにより撮影し、次いで、530nmのEYFPアクセプターの蛍光波長での画像を撮影した。両画像データをもとに両者の蛍光強度の比を求めることにより各測定点でのFRET効率を計算した。

実施例2 Ras活性を簡便に測定するための培養細胞株の取得

マウス線維芽細胞NIH3T3細胞は10%ウシ胎仔血清を含むDMEM培地（日本製薬社製）で培養した。かかるNIH3T3細胞に、実施例1で得られたpRaf ras 1722とG418耐性遺伝子を含むベクターpSV2neo（Genbank/EMBL: U02434）とを、FuGene 6（日本ロッシュ社製）を用いて共トランスフェクトした。該細胞を前記培地にて培養し、48時間培養後に1:1

0の希釈率で播きなおし、G418 (Gibco -BRL 社製) を0.5 mg/ml になるように培地中に添加した。培地は3日に一度交換した。培養2週間後、よく分離したコロニーをクローニングし、3T3-Rafras細胞と命名した。

かかる3T3-Rafras細胞を10%ウシ胎仔血清と0.5 mg/mlのG418とを含むDMEM培地(日水製薬社製)で培養し、Ras活性モニタータンパク質を発現させた。次いで、かかるタンパク質の発現を抗Ras抗体(Transduction Lab 社)を用いた通常のイムノブロッティング法にて解析した。その結果、約80 kDaのタンパク質の発現が認められた(第9図)。

さらに、かかる細胞を上皮細胞増殖因子(EGF)(Sigma社製)で刺激し、実施例1の(4)に記載の方法によりFRET効率を求め、EGF刺激前後で比較した。EGF添加前後における蛍光プロフィールを第10図に示す。

実施例3 Rai-chu311によるRap1A活性化の測定

(1) Rap1AとRalGDSをコードするキメラ遺伝子の作成

(i) Rap1A遺伝子の増幅

Rap1AのcDNA (Genbank/EMBL アccession番号: X12533) を鋳型として、センスプライマーhRap1Xh (5'-GGCTCGAGATGCGTGAGTACAAGCTAGTGG-3') (配列番号: 13) およびアンチセンスプライマーRap172RalGDS (5'-GCGGATGATACAGCAGTCGCCACCTCCGGATCCGCCGGTACCTCCACCACCGGTTCCACCTCCGGAGCCAT TGATCTTTGACTTTGCAGAAG-3') (配列番号: 14) と、前記Pfxとを用い、PCR法によりRap1Aの1位から172位のアミノ酸配列に対応するcDNA部分を増幅した。

センスプライマーhRap1Xhは、5'末端の下線で示した制限酵素XhoIの切断部位の塩基配列とRap1Aの1位から8位のアミノ酸配列に対応するcDNA部分の塩基配列とからなる。一方、アンチセンスプライマーRap172RalGDSは、5'末端より、RalGDS (Genbank/EMBL アccession番号:

U14417) の R a p 1 A 結合領域のアミノ酸配列のアミノ末端領域 (211 位から 217 位まで) に対応する cDNA 部分の相補鎖の塩基配列、スパーサー配列 (下線部)、R a p 1 A の 166 位から 172 位のアミノ酸配列に対応する cDNA 部分の相補鎖の塩基配列とからなる。

(ii) R a l G D S 遺伝子の増幅

R a l G D S の cDNA (Genbank/EMBL アccession 番号: U14417) を鋳型として、センスプライマー R a l G D S - F (5' -GGCGACTGCTGTATCATCCGC-3') (配列番号: 15) およびアンチセンスプライマー R a l G D S R (5' -CGCGGCCGCCCGCTTCTTGAGGACAAAGTC-3') (配列番号: 16) と前記 P f x とを用い、PCR 法により R a l G D S の cDNA を増幅した。

センスプライマー R a l G D S - F は、R a l G D S の cDNA の R a p 1 A 結合領域のアミノ酸配列のアミノ末端領域 (211 位から 217 位まで) に対応する cDNA 部分の塩基配列を有する。一方、アンチセンスプライマー R a l G D S R は、5' 末端の下線で示した制限酵素 N o t I の切断部位の塩基配列と R a l G D S の R a p 1 A 結合領域のアミノ酸配列のカルボキシル末端領域 (291 位から 297 位まで) に対応する cDNA 部分の塩基配列の相補鎖の塩基配列とからなる。

(iii) R a p 1 A と R a l G D S をコードするキメラ遺伝子の増幅

前記 (i) および (ii) で増幅された遺伝子を混合したものを鋳型として、センスプライマー h R a p 1 X h およびアンチセンスプライマー R a l G D S R と P f x とを用い、PCR 法により R a p 1 A と R a l G D S をコードするキメラ遺伝子からなる cDNA を増幅した。次いで、得られた DNA 断片を p C R - b l u n t I I - T O P O にライゲーションし、得られたプラスミド構築物で大腸菌を形質転換した。かかる大腸菌を培養後、公知のアルカリ SDS 法によりプラスミドを精製した。

(2) R a p 1 A 活性モニタータンパク質遺伝子の発現プラスミドである p R a

i - c h u 3 1 1 の構築

実施例 1 の (2) の (ii) において、アンチセンスプライマー G F P - N 3 に換えてアンチセンスプライマー G F P - d 1 1 R (5' - GGATCCGGTACCTCGAGGGCGGC GGTCACGA ACTCCAGCAG - 3') (配列番号 : 1 7) を用い同様の操作を行い、E C F P と、そのアミノ酸配列のカルボキシル末端のアミノ酸が 1 1 個欠損した E Y F P とをコードする c D N A を含むベクターを作成した。かかるベクターを X h o I と N o t I で切断した。次いで、該ベクターと、X h o I と N o t I で予め切断しておいた前記 (1) で得られたキメラ遺伝子とを T 4 D N A リガーゼで結合した。得られたプラスミドを p R a i - c h u 3 1 1 と命名した。得られたプラスミドの構造ならびに、その翻訳領域の塩基配列 (配列番号 : 1 8) および予測されるアミノ酸配列 (配列番号 : 1 9) を第 1 1 図と第 1 2 図～第 1 4 図にそれぞれ示す。

かかる塩基配列および予測されるアミノ酸配列を説明する :

nt 1 - 684 : オワンクラゲの E Y F P

nt 685 - 690 : リンカー

nt 691 - 1206 : R a p 1 A

nt 1207 - 1257 : リンカー

nt 1258 - 1515 : R a 1 G D S

nt 1516 - 1521 : リンカー

nt 1522 - 2235 : オワンクラゲの E C F P

(3) 哺乳類細胞での R a p 1 A 活性モニタータンパク質 (R a i - c h u 3 1 1) の発現と分光光度法による解析

実施例 1 の (4) に記載の方法により解析を行った。得られた蛍光プロフィールを第 1 5 図に示す。

実施例 4 R a i - c h u 1 5 8 による R - R a s 活性化の測定

(1) pRai-chu158の構築

(i) R-Ras遺伝子の増幅

R-RasのcDNA (Genbank/EMBL アccession番号 : M14948, M14949) を鋳型として、センスプライマーRRas28F (5'-CCCCTCGAGACACACAAGCTGGTGGTC-3') (配列番号 : 20) およびアンチセンスプライマーRRas204R (5'-GCCGGTACCGCCACTGGGAGGGCTCGGTGGGAG-3') (配列番号 : 21) と、前記Pfxとを用い、PCR法によりR-Rasの28位から204位のアミノ酸配列に対応するcDNA部分を増幅した。

センスプライマーRRas28Fは、5'末端の下線で示した制限酵素XhoIの切断部位の塩基配列とR-Rasの28位から33位のアミノ酸配列に対応するcDNA部分の塩基配列とからなる。一方、アンチセンスプライマーRRas204Rは、5'末端より、KpnI切断部位を含むスペーサー配列(下線部)、R-Rasの198位から204位のアミノ酸配列に対応するcDNA部分の相補鎖の塩基配列とからなる。

(ii) 制限酵素断片の作製

前記(i)で得られたPCR産物をXhoIとKpnIとで切断した。

(iii) R-Ras活性モニタータンパク質遺伝子の発現プラスミドであるpRai-chu158の構築

実施例1で得られたpRaf ras1722をXhoIで完全消化したのち、KpnIで部分消化し、Ras部分を除去したDNA断片を得た。該DNA断片と前記(ii)で得られたDNA断片とをT4DNAリガーゼで結合した。得られたプラスミドをpRai-chu158と命名した。該プラスミドの構造ならびに、その翻訳領域における塩基配列(配列番号 : 22) および予測されるアミノ酸配列(配列番号 : 23) を第16図と第17図～第19図にそれぞれ示す。

かかる塩基配列および予測されるアミノ酸配列を説明する :

nt 1 - 717 : オワンクラゲのEYFP

nt 718 - 723 : リンカー
nt 724 - 1251 : R-R a s
nt 1252 - 1257 : リンカー
nt 1258 - 1500 : R a f
nt 1501 - 1509 : リンカー
nt 1510 - 2220 : オワンクラゲの E C F P

(2) 哺乳類細胞での R-R a s 活性モニタータンパク質 (R a i - c h u 1 5 8) の発現と分光光度法による解析

実施例 1 の (4) に記載の方法により解析を行った。得られた蛍光プロフィールを第 20 図に示す。

実施例 5 R a s の標的タンパク質結合ドメインに温度感受性変異を有するモニタータンパク質をコードする遺伝子の構築

(1) p R a i - c h u 1 1 9 の構築

(i) 変異を有する R a s 遺伝子の増幅

実施例 1 にて用いた R a s の c D N A を鋳型として、センスプライマー h R a s X h (実施例 1 にて使用) とアンチセンスプライマー R a s I 3 6 L R (5' -G G A A T C C T C T A G A G T G G G T C G -3') (配列番号: 24) と前記 P f x とを用い、P C R 法により R a s の 1 位から 39 位のアミノ酸配列に対応する c D N A 部分を増幅した。

アンチセンスプライマー R a s I 3 6 L R は、R a s の 35 位から 42 位のアミノ酸配列に対応する c D N A 部分の配列を有し、下線で示した部分に I l e の L e u への点突然変異を有している。この変異は R a s の活性を温度感受性にすることが知られている (文献 8)。

同様に、R a s の c D N A を鋳型として、センスプライマー R a s I 3 6 L F (5' -G A C C C C A C T C T A G A G G A T T C C -3') (配列番号: 25) とアンチセンスプライマ

ーR a s 1 7 2 R a f（実施例1にて使用）と前記P f xとを用い、PCR法によりR a sのアミノ酸配列の32位から172位に対応するcDNA部分を増幅した。

得られた2つのDNA断片を混合し、センスプライマーhR a s X hとアンチセンスプライマーR a s 1 7 2 R a fとを用い、前記と同様にしてPCRを行い、R a sのアミノ酸配列の1位から172位に対応し、かつI l e 3 6のL e uへの点突然変異を含むDNAを増幅した。

(ii) 制限酵素断片の作製

上記PCR産物をX h o IとK p n Iとで切断した。

(iii) 実施例1で得られたpR a f r a s 1 7 2 2をX h o Iで完全消化したのち、K p n Iで部分消化し、R a sの部分除去したDNA断片を得た。該DNA断片と前記(ii)で得られたDNA断片とをT4DNAリガーゼで結合した。得られたプラスミドをpR a i - c h u 1 1 9と命名した。該プラスミドの翻訳領域における塩基配列（配列番号：26）および予測されるアミノ酸配列（配列番号：27）を第21図～第23図にそれぞれ示す。

(2) 哺乳類細胞でのモニタータンパク質（R a i - c h u 1 1 9）の発現と分光光度法による解析

ヒト胎児腎臓由来HEK293T細胞を10%ウシ胎仔血清を含むDMEM培地（日水製薬社製）で培養した。該HEK293T細胞に、実施例1において作成したpR a f r a s 1 7 2 2またはpR a i - c h u 1 1 9と、グアニンヌクレオチド交換因子S o s発現ベクター（pCAGGS-mS o s）とをリン酸カルシウム法にてトランスフェクトした。前記同培地にて24時間培養後に33℃および40℃のインキュベータに移し、さらに24時間、培養した。該細胞をリン酸緩衝生理食塩水にて洗浄した後、溶解液（20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100）にて溶解した。得られた細胞溶解液を10,000×gで遠心分離し上清を回収した。

該上清を蛍光分光光度計（日本分光社製、FP-750）の1ml キュベットに入れ、励起波長433nmにて、450nmから550nmまでの蛍光強度を測定した。得られた蛍光プロフィールを第24図に示す。

実施例6 R a f r a s 1 7 2 2を発現するトランスジェニックマウスの作成およびこのマウスの心筋培養細胞におけるR a s活性化の測定

(1) 実施例1で得られたp R a f r a s 1 7 2 2を制限酵素S p e IおよびB a m H Iで切断し、これをアガロース電気泳動にかけ、約4.5kbのプロモーター、イントロン、コーディング配列、ポリA付加シグナルを含む領域のDNA断片を得た。該DNAは電気溶出法にてゲルより取り出した後、Qiagen20チップ（キアゲン社）を用いて精製した。このDNAを定法に従い、マウス受精卵（DB F1、日本エスエルシー社）の前核に注入し、偽妊娠させたI C Rマウス（日本エスエルシー社）の卵管内に移植した。得られたマウスの離乳後、尾を1cm切断し、プロテイナーゼKを含むDNA抽出液（ABI 社）中で37℃にて一晩維持し、ここから、フェノールおよびフェノールクロロホルムにてタンパク質を除いた後に、等量のイソプロパノールを加えて、析出したDNAを回収した。回収したDNAを水にいれ、37℃で溶解させた。

(2) このマウスDNAを鋳型にして、センスプライマーR a f R B D x (5'-CTGAGCCTTCTAAGACAAGCAACACT-3') (配列番号: 28) とアンチセンスプライマーX F P N s e q (5'-CGTCGCCGTCAGCTCGACCAG-3') (配列番号: 29) とを用い、PCR法にてDNAを増幅した。このプライマーにより、R a f r a s 1 7 2 2遺伝子のうちのR a f 遺伝子とE C F P遺伝子の連結領域に相当するDNAが増幅できる。予期される314bpのバンドが現れるものを、R a f r a s 1 7 2 2のDNAの組み込みがあると判定した。35匹の仔マウスのうち7匹にこのバンドが確認できた。

(3) つぎに、このF1マウスをC57/Blackマウス（日本エスエルシー

社)と交配させた。F2のマウス新生児(0日齢)より、心室をとり、眼科用ハサミで細切した。ここに、0.05%トリプシンと0.5mM EDTAとを含むPBSを加え、37℃で細胞を10分間処理し、剥離してきた心筋細胞を回収した。この操作を6回繰り返して、心筋細胞を集めた。ここに、10%ウシ胎仔血清を含むDMEM培地を加え、低速遠心にて心筋細胞を沈殿させ、上清を捨てた。回収した心筋細胞を10%ウシ胎仔血清を含むDMEMで培養した。

(4) 得られた心筋細胞をガラス底の培養皿(φ35mm)に移して底面に付着させ、無血清培地(日本製薬製)中で6時間培養を行った。次いで、当該心筋培養細胞にEGFを100ng/ml添加し、実施例1の(5)に記載の蛍光顕微鏡システムで観察した。EGF添加による細胞内におけるECFPおよびEYFPの蛍光強度の経時的変化の結果を第25図に示す。トランスジェニックマウス由来の初代培養細胞でもEGF依存的にRasの活性化が測定できることを確認した。

配列表フリーテキスト

配列番号: 1は、制限酵素XhoIの切断部位の塩基配列とヒトH-Rasの塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

配列番号: 2は、ヒトc-Raf1の塩基配列とヒトH-Rasの塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

配列番号: 3は、制限酵素KpnIの切断部位の塩基配列とヒトc-Raf1の塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

配列番号: 4は、制限酵素NotIの切断部位の塩基配列とヒトc-Raf1の塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

配列番号: 5は、pBluescript-SKII(+)のマルチプルクロニングサイトの5'側の塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

配列番号：6は、pBlue-script-SKII (+) のマルチプルクロニングサイトの3'側の塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

配列番号：7は、制限酵素BamHIの切断部位の塩基配列とEYFPの塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

配列番号：8は、制限酵素BamHI、KpnIおよびXhoIの各々の切断部位の塩基配列とECFPの塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

配列番号：9は、制限酵素NotIの切断部位の塩基配列とECFPの塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

配列番号：10は、制限酵素BglIIの切断部位の塩基配列とECFPの塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

配列番号：11は、ヒトH-Ras、ヒトc-Raf1、EYFPおよびECFPの各塩基配列を基にデザインしたプラスミドの塩基配列である。

配列番号：12は、配列番号：11のプラスミドの塩基配列から予測されるアミノ酸配列である。

配列番号：13は、制限酵素XhoIの切断部位の塩基配列とヒトRaplAの塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

配列番号：14は、ヒトRalGDSの塩基配列とヒトRaplAの塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

配列番号：15は、ヒトRalGDSの塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

配列番号：16は、制限酵素NotIの切断部位の塩基配列とヒトRalGDSの塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

配列番号：17は、制限酵素BamHI、KpnIおよびXhoIの各々の切断部位の塩基配列とECFPの塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配

列である。

配列番号：18は、ヒトR a p 1 A、ヒトR a 1 G D S、E Y F PおよびE C F Pの各塩基配列を基にデザインしたプラスミドの塩基配列である。

配列番号：19は、配列番号：18のプラスミドの塩基配列から予測されるアミノ酸配列である。

配列番号：20は、制限酵素X h o Iの切断部位の塩基配列とヒトR - R a sの塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

配列番号：21は、制限酵素K p n Iの切断部位の塩基配列とヒトR - R a sの塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

配列番号：22は、ヒトR - R a s、ヒトc - R a f 1、E Y F PおよびE C F Pの各塩基配列を基にデザインしたプラスミドの塩基配列である。

配列番号：23は、配列番号：22のプラスミドの塩基配列から予測されるアミノ酸配列である。

配列番号：24は、ヒトH - R a sの塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

配列番号：25は、ヒトH - R a sの塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

配列番号：26は、ヒトH - R a s、ヒトc - R a f 1、E Y F PおよびE C F Pの各塩基配列を基にデザインしたプラスミドの塩基配列である。

配列番号：27は、配列番号：26のプラスミドの塩基配列から予測されるアミノ酸配列である。

配列番号：28は、ヒトc - R a f 1のヒトH - R a s結合領域の塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

配列番号：29は、E C F Pの塩基配列を基にデザインしたプライマーの塩基配列である。

産業上の利用可能性

本発明によれば、非侵襲的な低分子量GTP結合タンパク質の活性化の測定を可能にする低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質、該タンパク質を発現し、非侵襲的な低分子量GTP結合タンパク質の活性化の測定に有用な細胞およびトランスジェニック動物、ならびに前記タンパク質を用いる低分子量GTP結合タンパク質の活性化を測定する方法、より詳しくは生細胞においても使用可能な、低分子量GTP結合タンパク質のGTP結合型とGDP結合型の量比を測定する方法が提供される。

請求の範囲

1. 低分子量GTP結合タンパク質の全部または一部、該低分子量GTP結合タンパク質の標的タンパク質の全部または一部、GFPアクセプタータンパク質の全部または一部、及びGFPドナータンパク質の全部または一部が、各タンパク質の機能を発揮し得る状態で直接または間接的に連結されてなる融合タンパク質からなる低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質。
2. さらに、細胞内局在シグナルを付加してなる請求項1記載の低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質。
3. さらに、低分子量GTP結合タンパク質と標的タンパク質との間にスペーサーとなるペプチドを有してなる請求項1または2記載の低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質。
4. 低分子量GTP結合タンパク質がRasスーパーファミリーに属するものである請求項1～3いずれか記載の低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質。
5. 低分子量GTP結合タンパク質がRasファミリーに属するものである請求項1～4いずれか記載の低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質。
6. 低分子量GTP結合タンパク質がH-Ras、K-Ras、N-Ras、R-Ras、Rap1A、Rap1B、Rap2A、およびRap2Bからなる群より選ばれる1種である請求項1～5いずれか記載の低分子量GTP結合タン

パク質の活性モニタータンパク質。

7. 標的タンパク質がR a fまたはR a l G D Sである請求項1～6いずれか記載の低分子量G T P結合タンパク質の活性モニタータンパク質。

8. G F Pアクセプタータンパク質がE G F PまたはE Y F Pである請求項1～7いずれか記載の低分子量G T P結合タンパク質の活性モニタータンパク質。

9. G F Pドナータンパク質がE C F PまたはE B F Pである請求項1～8いずれか記載の低分子量G T P結合タンパク質の活性モニタータンパク質。

10. 低分子量G T P結合タンパク質および／または標的タンパク質が変異を有するものである請求項1～9いずれか記載の低分子量G T P結合タンパク質の活性モニタータンパク質。

11. 低分子量G T P結合タンパク質のアミノ酸配列のアミノ末端領域および／またはカルボキシル末端領域に少なくとも1個のアミノ酸の欠損を有してなる請求項1～10いずれか記載の低分子量G T P結合タンパク質の活性モニタータンパク質。

12. G F Pアクセプタータンパク質および／またはG F Pドナータンパク質のアミノ酸配列のカルボキシル末端領域に少なくとも1個のアミノ酸の欠損を有してなる請求項1～11いずれか記載の低分子量G T P結合タンパク質の活性モニタータンパク質。

13. 低分子量G T P結合タンパク質がH-R a sであり、標的タンパク質が

R a fである請求項1～12いずれか記載の低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質。

14. 低分子量GTP結合タンパク質がR a p 1 Aであり、標的タンパク質がR a 1 G D Sである請求項1～12いずれか記載の低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質。

15. 低分子量GTP結合タンパク質がH-R a sであり、標的タンパク質がR a fであり、GFPドナータンパク質がE C F Pであり、GFPアクセプタータンパク質がE Y F Pである請求項1～12いずれか記載の低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質。

16. アミノ末端側より、E Y F P、H-R a s、R a f、E C F Pの順で直接または間接的に連結されてなる請求項15記載の低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質。

17. 低分子量GTP結合タンパク質がR a p 1 Aであり、標的タンパク質がR a 1 G D Sであり、GFPドナータンパク質がE C F Pであり、GFPアクセプタータンパク質がE Y F Pである請求項1～12いずれか記載の低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質。

18. アミノ末端側より、E Y F P、R a p 1 A、R a 1 G D S、E C F Pの順で直接または間接的に連結されてなる請求項17記載の低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタータンパク質。

19. 請求項1～18いずれか記載の低分子量GTP結合タンパク質の活性モ

ニタータンパク質をコードする遺伝子。

20. 請求項19記載の遺伝子を含む発現ベクター。

21. 発現プラスミドである請求項20記載の発現ベクター。

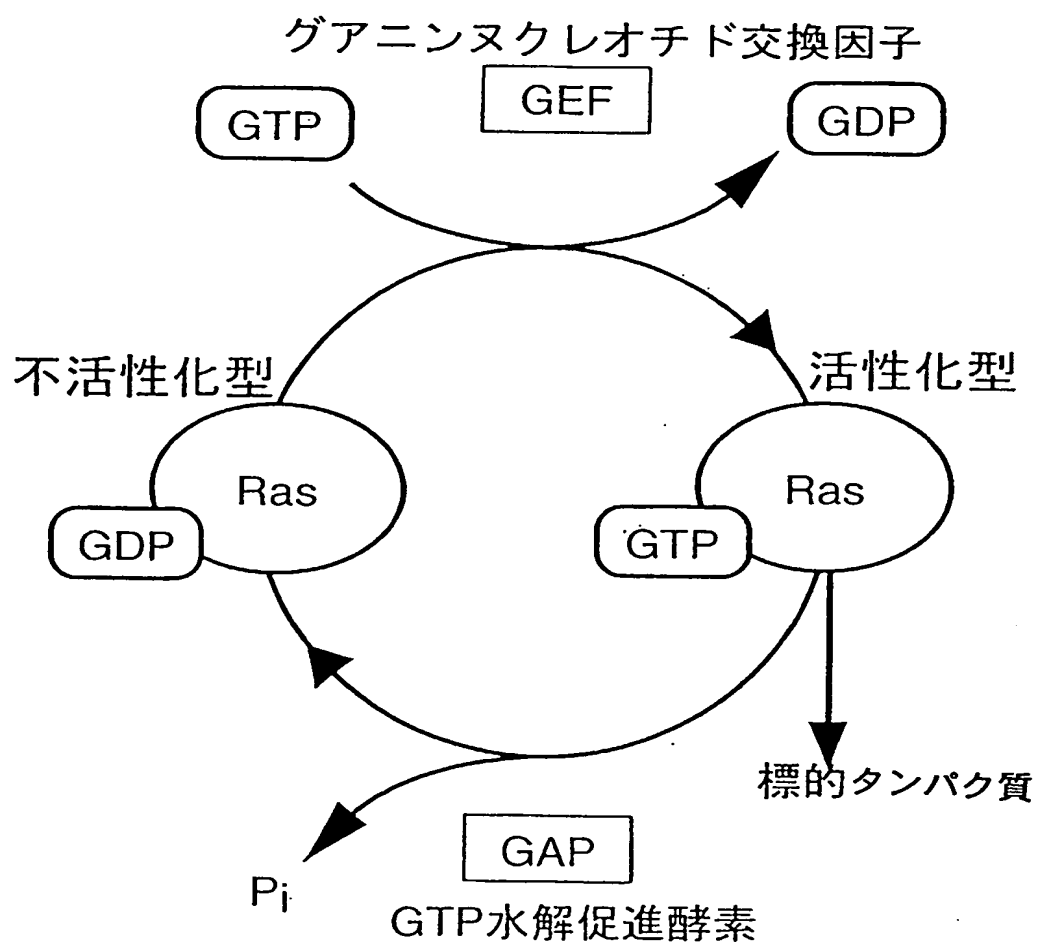
22. 請求項20または21記載の発現ベクターを保持してなる形質転換された細胞。

23. 請求項20または21記載の発現ベクターを保持してなるトランスジェニック動物。

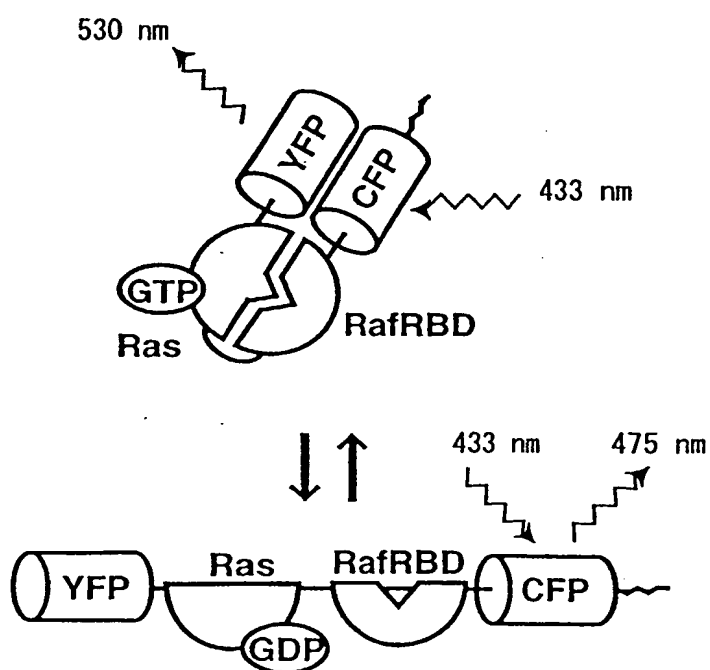
24. 請求項1～18いずれか記載の低分子量GTP結合タンパク質の活性モニタタンパク質におけるFRETを検出する工程を含む低分子量GTP結合タンパク質の活性化を測定する方法。

25. 請求項22記載の細胞または請求項23記載のトランスジェニック動物におけるFRETを検出する工程を含む低分子量GTP結合タンパク質の活性化を測定する方法。

26. GTPの結合した低分子量GTP結合タンパク質と、GTPからの無機リン酸の遊離によって生じるGDPの結合した低分子量GTP結合タンパク質とを測定してGTP/GDP比（モル比）を算出する工程をさらに含む請求項25記載の低分子量GTP結合タンパク質の活性化を測定する方法。



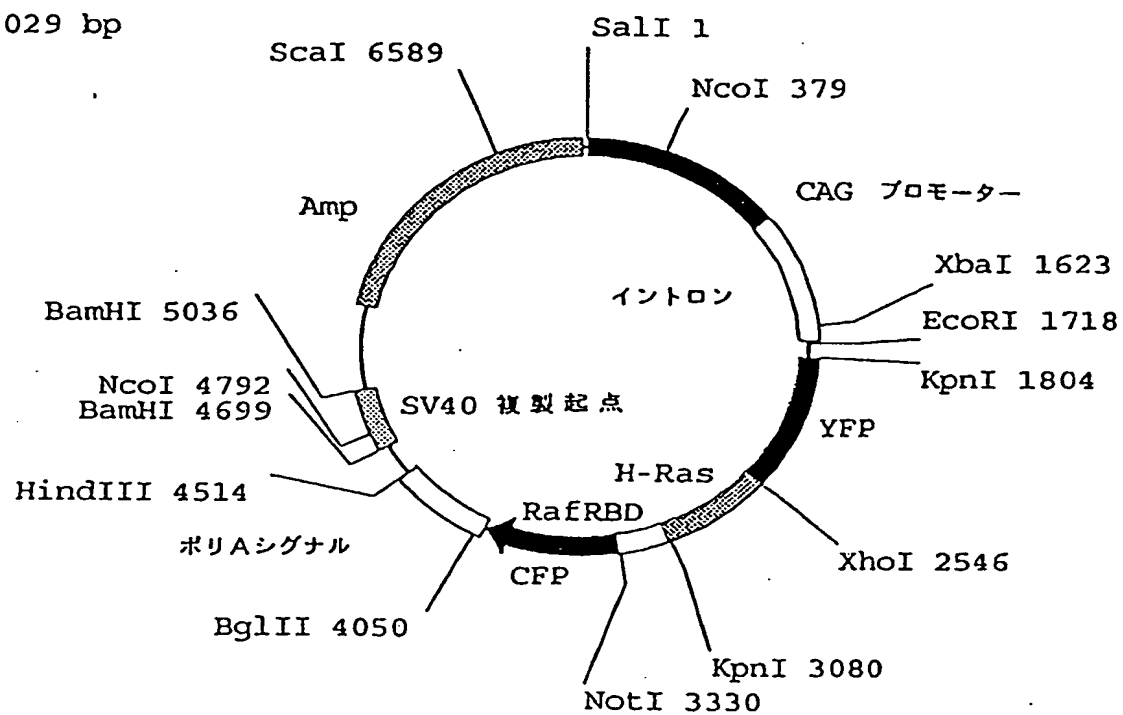
第1図



第 2 図

pRafras1722

7029 bp



第3図

pRafras1722 の翻訳領域の塩基配列および予測されるアミノ酸配列

```

      10      20      30      40      50      60
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGAC
M Y S K G E E L F T G V V P I L V E L D

      70      80      90     100     110     120
GGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC
G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y

      130     140     150     160     170     180
GGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTCCCTGGCCACC
G K L T L K F I C T T G K L P V P W P T

      190     200     210     220     230     240
CTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGAAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAG
L V T T F G Y G L K C F A R Y P D H M K

      250     260     270     280     290     300
CAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTC
Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F

      310     320     330     340     350     360
TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCCGCCGAGGTGAAGTTCGAGCGCGACACCTG
F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L

      370     380     390     400     410     420
GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAC
V N R I E L K G I D F K E D G N I L G H

      430     440     450     460     470     480
AAGCTGGAGTACAATAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC
K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K N

      490     500     510     520     530     540
GGCATCAAGGTGAAGTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCC
G I K V N F K I R H N I E D G S V Q L A

      550     560     570     580     590     600
GACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGCCGACGGCCCGTGTGCTGCCCGACAACAC
D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H

      610     620     630     640     650     660
TACCTGAGCTACCACTCGCCCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTC
Y L S Y Q S A L S K D P N E K R D H M V

      670     680     690     700     710     720
CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGCTC
L L E F V T A A G I T L G M D E L Y K L

      730     740     750     760     770     780
GAGATGACGAATATAAGCTGGTGGTGGTGGCGCCGCGGTGTGGCAAGAGTGGCTG
E M T E Y K L V V V G A G G V G K S A L

      790     800     810     820     830     840
ACCATCCAGCTGATCCAGAACCATTTTGTGGACGAATACGACCCCACTATAGAGGATTCC
T I Q L I Q N H F V D E Y D P T I E D S

      850     860     870     880     890     900
TACCGGAAGCAGGTGGTCATTGATGGGGAGACGTGCCCTGTTGGACATCCTGGATACGGCC
Y R K Q V V I D G E T C L L D I L D T A

      910     920     930     940     950     960
GGCCAGGAGGAGTACAGCCCATGCCGGACCACTACATGCCACCGGGGAGGCTTCCTG
G Q E E Y S A M R D Q Y M R T G E G F L

      970     980     990    1000    1010    1020
TGTGTGTTGCCATCAACAACCAAGTCTTTTGAGGACATCCACCACTACAGGAGCAG
C V F A I N N T K S F E D I H Q Y R E Q

```

第 4 図

pRafra1722 の翻訳領域の塩基配列および予測されるアミノ酸配列 (つづき)

```
1030      1040      1050      1060      1070      1080
ATCAAACGGGTGAAGGACTCGGATGACGTGCCCATGGTGGTGGGGAACAAGTGTGAC
I K R V K D S D D V P M V L V G N K C D

1090      1100      1110      1120      1130      1140
CTGGCTGCACGCACTGTGGAATCTCGGCAGGCTCAGGACCTCGCCGAAGCTACGGCATC
L A A R T V E S R Q A Q D L A R S Y G I

1150      1160      1170      1180      1190      1200
CCCTACATCGAGACCTCGGCCAAGACCCGGCAGGAGTGGAGGATGCCITCTACACGTTG
P Y I E T S A K T R Q G V E D A F Y T L

1210      1220      1230      1240      1250      1260
GTGCGTGAGATCCGGCAGCACAAGCTCGGGAAGCTGAACGGCTCCGAGGTGCTACCCCT
V R E I R Q H K L R K L N G S G G G T P

1270      1280      1290      1300      1310      1320
TCTAAGACAAGCAACACTATCCGTGTTTTCTTGCAGAACAAAGCAAGCAAGTGGTCAAT
S K T S N T I R V F L P N K Q R T V V N

1330      1340      1350      1360      1370      1380
GTGCCAATGGAATGAGCTTGCATGACTGCCCTTATGAAAGCACTCAAGGTGAGGGGCTG
V R N G M S L H D C L M K A L K V R G L

1390      1400      1410      1420      1430      1440
CAACCAGAGAGCTGTGCACTGTTGAGACTTCTCCACGAACACAAAGTAAAAAGCACGC
Q P E S C A V F R L L H E H K G K K A R

1450      1460      1470      1480      1490      1500
TTAGATTGGAATACTGAAGCTGCGTCTTTGATTGGAGAAGAACTTACGTAGATTTCCTG
L D W N T E A A S L I G E E L H V D F L

1510      1520      1530      1540      1550      1560
GGCGGCGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTCACCGGGTGGTGGCCATCCTGGTC
G G R M V S K G E E L F T C V V P I L V

1570      1580      1590      1600      1610      1620
GAGCTGACCGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCTGTCGGCGCAGGGCGAGGGGAT
E L D G D V N G H K F S V S G E G E G D

1630      1640      1650      1660      1670      1680
GCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACGGCAAGCTGCCCGTGCCC
A T Y G K L T L K F I C T T G K L P V P

1690      1700      1710      1720      1730      1740
TGGCCCAACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCACTTCAAGCGCTACCCCGAC
W P T L V T T L T W G V Q C F S R Y P D

1750      1760      1770      1780      1790      1800
CACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCG
H M K Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R

1810      1820      1830      1840      1850      1860
ACCATCTTCTCAAGGACGACGCAACTACAAGACCCGCGGAGGTGAAGTTCGAGGGC
T I F F K D D G N Y K T R A E V K F E G

1870      1880      1890      1900      1910      1920
GACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATC
D T L V N R I E L K G I D F K E D G N I

1930      1940      1950      1960      1970      1980
CTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAG
L G H K L E Y N Y I S H N V Y I T A D K

1990      2000      2010      2020      2030      2040
CAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTG
Q K N G I K A N F K I R H N I E D G S V

2050      2060      2070      2080      2090      2100
CAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCCCC
```

第 5 図

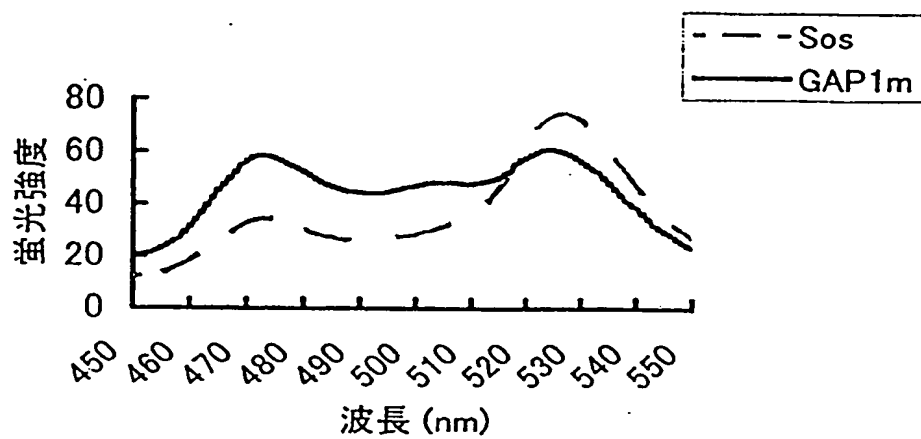
pRafra1722 の翻訳領域の塩基配列および予測されるアミノ酸配列 (つづき)

```
Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P
      2110      2120      2130      2140      2150      2160
GACAACCACTACTTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGAT
D N H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D
      2170      2180      2190      2200      2210      2220
CACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTG
H M V L L E F V T A A G I T L G M D E L
      2230
TAG
*
```

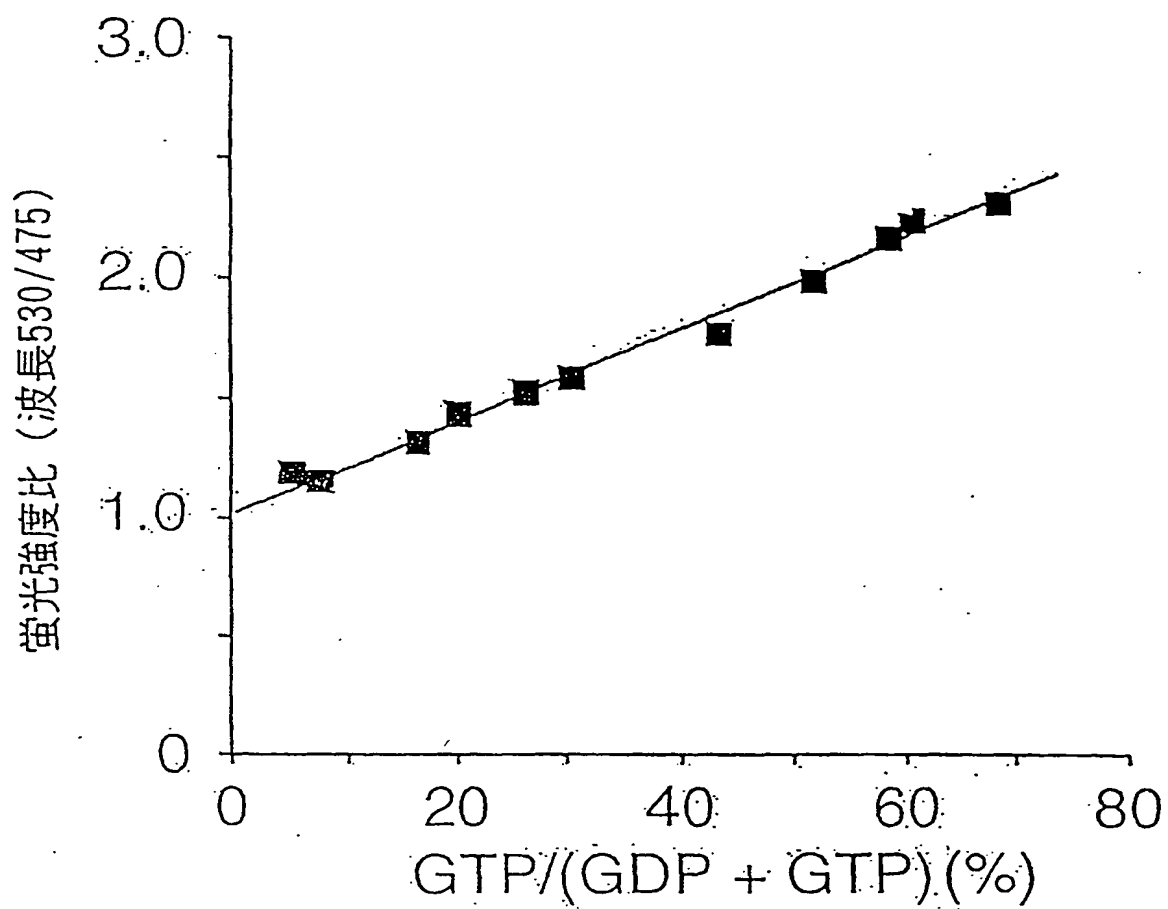
第 6 図

6/25

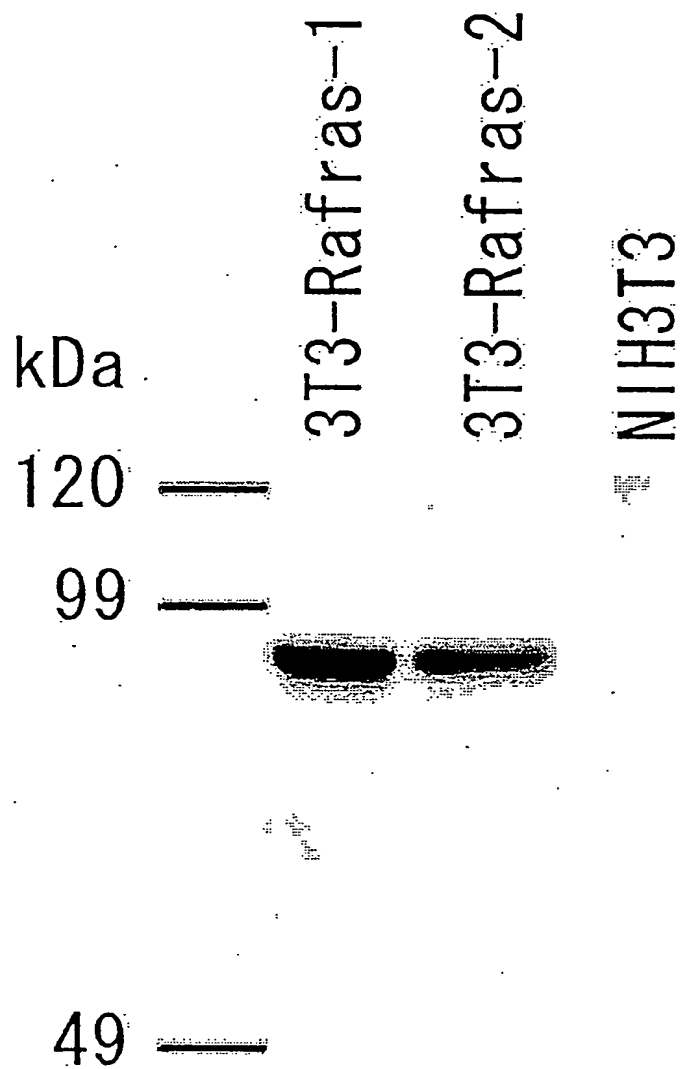
Rafras1722 の蛍光プロフィール



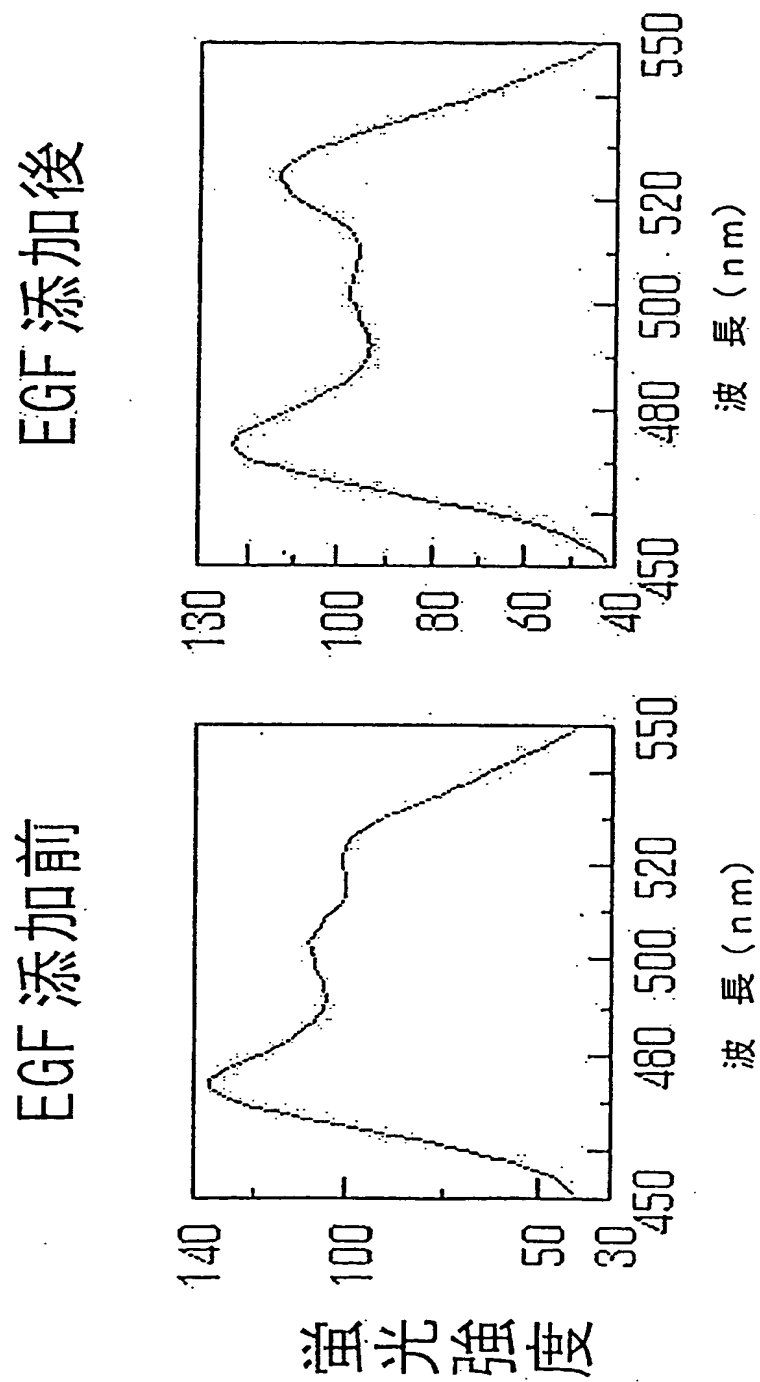
第 7 図



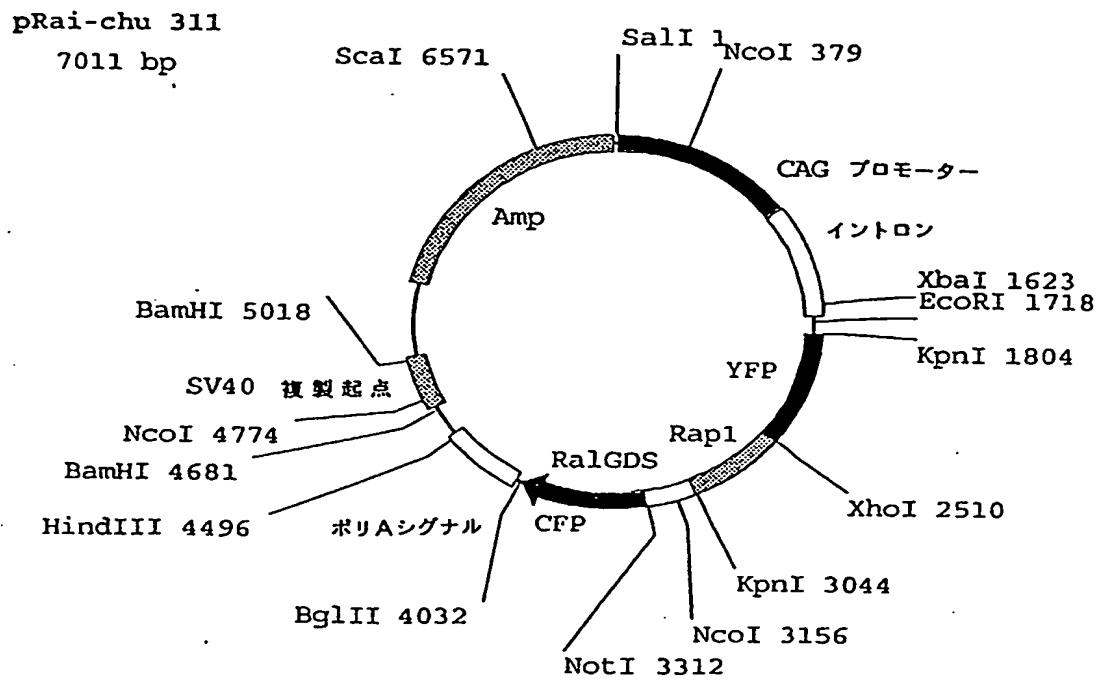
第 8 図



第 9 図



第 10 図



第 11 図

pRai-chu311 の翻訳領域の塩基配列および予測されるアミノ酸配列

```

      10      20      30      40      50      60
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC
M V S K G E E L F T G V V P I L V E L D

      70      80      90     100     110     120
GGCGACGTAAACGGCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC
G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y

      130     140     150     160     170     180
GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCCTGCCCTGCCCCACC
G K L T L K F I C T T G K L P V P W P T

      190     200     210     220     230     240
CTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGaAGTGCTTCGCCCCGTACCCCGACCACATGAAG
L V T T F G Y G L K C F A R Y P D H M K

      250     260     270     280     290     300
CAGCAGGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTC
Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F

      310     320     330     340     350     360
TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTG
F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L

      370     380     390     400     410     420
GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAC
V N R I E L K G I D F K E D G N I L G H

      430     440     450     460     470     480
AAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC
K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K N

      490     500     510     520     530     540
GGCATCAAGGTGAAGTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCC
G I K V N F K I R H N I E D G S V Q L A

      550     560     570     580     590     600
GACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCAC
D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H

      610     620     630     640     650     660
TACCTGAGCTACCAAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATC.CATGGTC
Y L S Y Q S A L S K D P N E K R D H M V

      670     680     690     700     710     720
CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCctcgagATGCGTGAGTACAAGCTAGTGGTCCTTGGT
L L E F V T A A L E M R E Y K L V V L G

      730     740     750     760     770     780
TCAGGAGGCGTTGGGAAGTCTGCTCTGACAGTTTCAGTTTGTTCAGGGAATTTTGTGTA
S G G V G K S A L T V Q F V Q G I F V E

```

第 12 図

pRai-chu311 の翻訳領域の塩基配列および予測されるアミノ酸配列 (つづき)

```
790      800      810      820      830      840
AAATATGACCCAACGATAGAAAGATTCTACAGAAAGCAAGTTGAAGTCGATTGCCAACAG
K Y D P T I E D S Y R K Q V E V D C Q Q

850      860      870      880      890      900
TGTATGCTCGAAATCCTGGATACTGCAGGGACAGAGCAATTTACAGCAATGAGGGATTG
C M L E I L D T A G T E Q F T A M R D L

910      920      930      940      950      960
TATATGAAGAACGGCCAAGGTTTTGCACTAGTATATTCTATTACAGCTCAGTCCACGTTT
Y M K N G Q G F A L V Y S I T A Q S T F

970      980      990      1000      1010      1020
AACGACTTACAGGACCTGAGGGAACAGATTTTACGGGTTAAGGACACGGAAGATGTTCCA
N D L Q D L R E Q I L R V K D T E D V P

1030      1040      1050      1060      1070      1080
ATGATTTTGGTTGGCAATAAATGTGACCTGGAAGATGAGCGAGTAGTTGGCAAAGAGCAG
M I L V G N' K C D L E D E R V V G K E Q

1090      1100      1110      1120      1130      1140
GGCCAGAATTTAGCAAGACAGTGGTGAACCTGTGCCTTTTTAGAACTCTTCTGCAAAGTCA
G Q N L A R Q W C N C A F L E S S A K S

1150      1160      1170      1180      1190      1200
AAGATCAATGTTAATGAGATATTTTATGACCTGGTCAGACAGATAAATAGGAAAACACCA
K I N. V N E I F Y D L V R Q I N R K T P

1210      1220      1230      1240      1250      1260
GTGGAAGGCTCCGGAGGTGGAACCGGTGGTGGAggtaccGGCGGATCCGGAGGTGGCGAC
V E G S G G G T G G G G T G G S G G G D

1270      1280      1290      1300      1310      1320
TGCTGTATCATCCGCGTCAGCCTGGACGTGGACAATGGCAACATGTACAAGAGCATCCTG
C C I I R V S L D V D N G N M Y K S I L

1330      1340      1350      1360      1370      1380
GTGACCAGCCAAGATAAGGCTCCGGCTGTAATCCGCAAGGCCATGGACAAACACAACCTG
V T S Q D K A P A V I R K A M D K H N L

1390      1400      1410      1420      1430      1440
GAGGAGGAGGAGCCGGAGGACTATGAGCTGCTGCAGATTCTCTCAGATGACCGGAAGCTG
E E E E P E D Y E L L Q I L S D D R K L

1450      1460      1470      1480      1490      1500
AAGATCCCTGAAAACGCCAACGCTTCTATGCCATGAACCTCTACCGCCAACCTATGACTTT
K I P E N A N V F Y A M N S T A N Y D F

1510      1520      1530      1540      1550      1560
GTCCTCAAGAAGCGGGgcggccgcATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTG
V L K K R G G R M V S K G E E L F T G V

1570      1580      1590      1600      1610      1620
GTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGC
V P I L V E L D G D V H G H K F S V S G

1630      1640      1650      1660      1670      1680
GAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGC
E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T G

1690      1700      1710      1720      1730      1740
AAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTGGGGCGTGCASTGCTTC
```

第 13 図

pRai-chu311 の翻訳領域の塩基配列および予測されるアミノ酸配列 (つづき)

K L P V P W P T L V T T L T W G V Q C F

1750 1760 1770 1780 1790 1800
AGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGC
S R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G

1810 1820 1830 1840 1850 1860
TACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAG
Y V Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E

1870 1880 1890 1900 1910 1920
GTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAG
V K F E G D T L V N R I E L K G I D F K

1930 1940 1950 1960 1970 1980
GAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACATCAGCCACAACGTCTAT
E D G N I L G H K L E Y N Y I S H N V Y

1990 2000 2010 2020 2030 2040
ATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATC
I T A D K Q K N G I K A N F K I R H N I

2050 2060 2070 2080 2090 2100
GAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGC
E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G

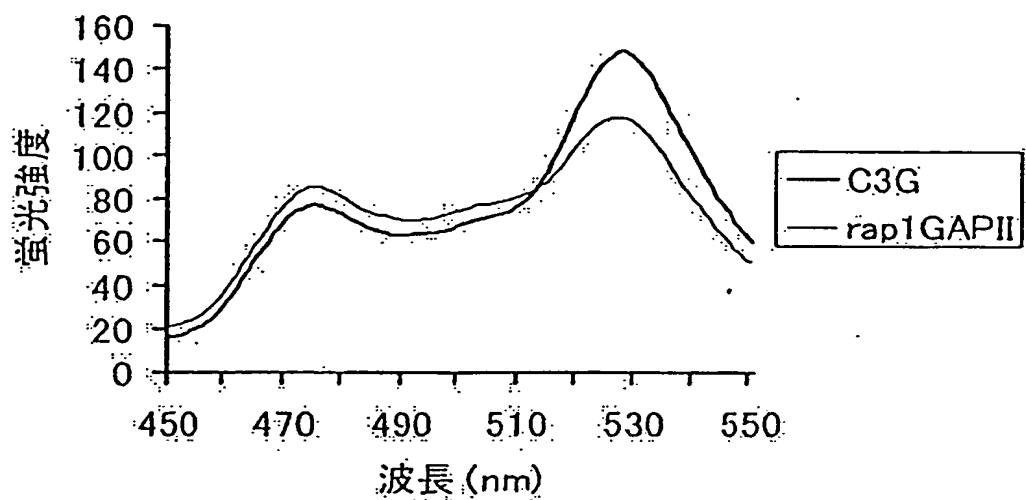
2110 2120 2130 2140 2150 2160
CCCGTGCTGCTGCCCCACAACCACTACTTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCC
P V L L P D N H Y L S T Q S A L S K D P

2170 2180 2190 2200 2210 2220
AACGAGAAGCGGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTC
N E K R D H M V L L E F V T A A G I T L

2230 2240
GGCATGGACGAGCTGtag
G M D E L *

第 14 図

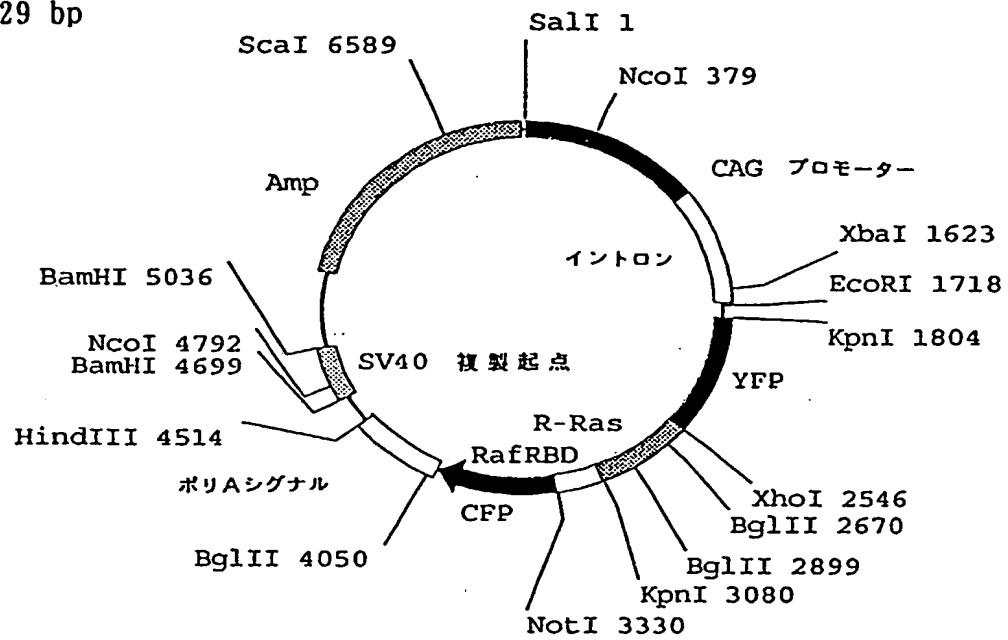
Rai-chu311 の蛍光プロフィール



第 15 図

pRai-chu158

7029 bp



第 16 図

16/25

pRai-chul58 の翻訳領域の塩基配列および予測されるアミノ酸配列

```

      10      20      30      40      50      60
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCCAGCTGCAC
M V S K G E E L F T G V V P I L V E L D

      70      80      90     100     110     120
GGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC
G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y

      130     140     150     160     170     180
GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCCACC
G K L T L K F I C T T G K L P V P W P T

      190     200     210     220     230     240
CTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGaAGTGCTTEGCCCCGCTACCCCGACCACATGAAG
L V T T F G Y G L K C F A R Y P D H M K

      250     260     270     280     290     300
CAGCAGGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTC
Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F

      310     320     330     340     350     360
TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCCCGAGGTGAAGTTTCGAGGGCGACACCCTG
F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L

      370     380     390     400     410     420
GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAC
V N R I E L K G I D F K E D G N I L G H

      430     440     450     460     470     480
AAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC
K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K N

      490     500     510     520     530     540
GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGTCCGCC
G I K V N F K I R H N I E D G S V Q L A

```

第 17 図

pRai-chu158 の翻訳領域の塩基配列および予測されるアミノ酸配列 (つづき)

```
550      560      570      580      590      600
GACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGCGACGGCCCGTGTCTGCTGCCGACAACAC
D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H

610      620      630      640      650      660
TACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTC
Y L S Y Q S A L S K D P N E K R D H M V

670      680      690      700      710      720
CTGCTCGAGTTCTGTACCGCCCGCGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGCTC
L L E F V T A A G I T L G M D E L Y K L

730      740      750      760      770      780
GAGACACACAAGCTGCTGCTGCTGGCGCGCGCGCTCGCCAAGAGCCGCTGACCATC
E T H K L V V Y G G G G V G K S A L T I

790      800      810      820      830      840
CAGTTCATCCAGTCTCTACTTCTGTCTGACTACGACCCCACTATTGAGGACTCCTACAG
Q F I Q S Y F V S D Y D P T I E D S Y T

850      860      870      880      890      900
AAGATCTGCAGTGTGGATGGCATCCAGCCCGCTGGACATCTGGACACCGCGGCGCAG
K I C S V D G I P A R L D I L D T A G Q

910      920      930      940      950      960
GAAGAGTTCGGCGCCATGAGAGAGCAGTACATGCGTCTGCCACCGCTTCTCTGCTGTC
E E F G A M R E Q Y M R A G H G F L L V

970      980      990      1000      1010      1020
TTCGCCATTAATGACCGGCAGAGTTTCAACGAGGTGGCAAGCTCTTACGCAGATTCTG
F A I N D R Q S F N E V G K L F T Q I L

1030      1040      1050      1060      1070      1080
CGGCTCAAGGACCGCAGCACTTCCCGTTGTGTTGGTCCGGAACAAGGCAGATCTCGAG
R V K D R D D F P V V L V G N K A D L E

1090      1100      1110      1120      1130      1140
TCACAGCGCCAGGTCCCGGATCAGAAGCCTCTGCCTTCGGCGCCTCCACCCAGTGGCC
S Q R Q V P R S E A S A F G A S H H V A

1150      1160      1170      1180      1190      1200
TACTTTGAGCCTCGGCCAACTGCGTCTCAACGTGACGAGCGCTTTTACGAGCTGCTG
Y F E A S A K L R L N V D E A F E Q L V

1210      1220      1230      1240      1250      1260
CGGCTCTCCGGAATACCAGGAACAAGAGCTCCACCGAGCCCTCCAGTGGTACCCT
R A V R K Y Q E Q E L P P S P P S G T P

1270      1280      1290      1300      1310      1320
TCTAAGACAAGCAACTATCCGTGTTTCTTCCGGAACAAGCAAGCAAGTGGTCAAT
S K T S N T I R V F L P N K Q R T V V N

1330      1340      1350      1360      1370      1380
GTCCGAAATGGAATGAGCTTGATGACTGCCTTATGAAAGCACTCAAGGTGAGGGCCTG
V R N G M S L H D C L M K A L K V R G L

1390      1400      1410      1420      1430      1440
CAACCAGAGAGCTGTGCTGCTTCACTTCTCCACGAACACAAGGTAAGGACACGC
Q P E S C A V F R L L H E H K G K K A R

1450      1460      1470      1480      1490      1500
TTAGATTGGAATACTGAAGCTGCGTCTTTGATTGGAGAAGCACTTACGTAGATTTCCTG
L D W N T E A A S L I G E E L H Y D F L

1510      1520      1530      1540      1550      1560
GGCGCCCGCATGCTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGTGGTGGCCATCCTGGTC
G G R M V S K G E E L F T G V V P I L V

1570      1580      1590      1600      1610      1620
GAGCTGACCGCGACGTAACCGCCACAAGTTACCGCTGTCGCGGAGCGCGAGCGCGAT
```

第 18 図

pRai-chu158 の翻訳領域の塩基配列および予測されるアミノ酸配列 (つづき)

E L D G D V N G H K F S V S G E G E G D

1630 1640 1650 1660 1670 1680
GCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCC
A T Y G K L T L K F I C T T G K L P V P

1690 1700 1710 1720 1730 1740
TGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGAC
W P T L V T T L T W G V Q C F S R Y P D

1750 1760 1770 1780 1790 1800
CACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGC
H M K Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R

1810 1820 1830 1840 1850 1860
ACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGC
T I F F K D D G N Y K T R A E V K F E G

1870 1880 1890 1900 1910 1920
GACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATC
D T L V N R I E L K G I D F K E D G N I

1930 1940 1950 1960 1970 1980
CTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAG
L G H K L E Y N Y I S H N V Y I T A D K

1990 2000 2010 2020 2030 2040
CAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTG
Q K N G I K A N F K I R H N I E D G S V

2050 2060 2070 2080 2090 2100
CAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCC
Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P

2110 2120 2130 2140 2150 2160
GACAACCACTACITGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGAT
D N H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D

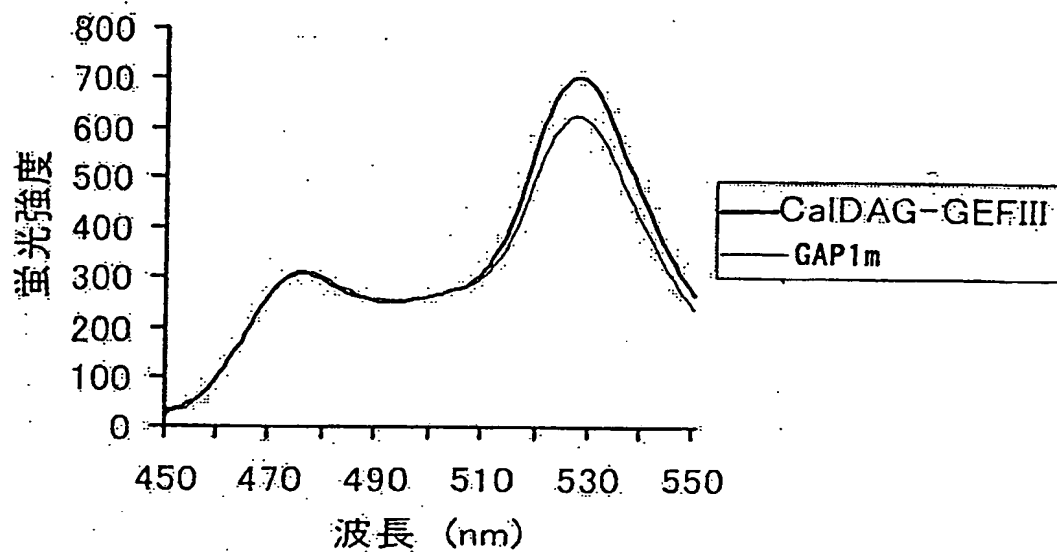
2170 2180 2190 2200 2210 2220
CACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTG
H M V L L E F V T A A G I T L G M D E L

2230

tag
*

第 19 図

Rai-chu158 の蛍光プロフィール



第 20 図

20/25

pRai-chu119 の翻訳領域の塩基配列および予測されるアミノ酸配列

```
      10      20      30      40      50      60
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC
M V S K G E E L F T G V V P I L V E L D

      70      80      90     100     110     120
GGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC
G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y

     130     140     150     160     170     180
GGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACC
G K L T L K F I C T T G K L P V P W P T

     190     200     210     220     230     240
CTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGAAGTGCTTCGCCCCTACCCCGACCACATGAAG
L V T T F G Y G L K C F A R Y P D H M K

     250     260     270     280     290     300
CAGCAGCTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGACCATCTTC
Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F

     310     320     330     340     350     360
TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTG
F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L

     370     380     390     400     410     420
GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAC
V N R I E L K G I D F K E D G N I L G H

     430     440     450     460     470     480
AAGCTGGAGTACAAC TACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC
K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K N

     490     500     510     520     530     540
GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCC
G I K V N F K I R H N I E D G S V Q L A

     550     560     570     580     590     600
GACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCAC
D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H

     610     620     630     640     650     660
TACCTGAGCTACCACTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTC
Y L S Y Q S A L S K D P N E K R D H M V

     670     680     690     700     710     720
CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGCTC
L L E F V T A A G I T L G M D E L Y K L

     730     740     750     760     770     780
GAGATGACGGAATATAAGCTGGTGGTGGTGGGCGCCGGTGTGGGCAAGAGTGCCTG
E M T E Y K L V V V G A G G V G K S A L
```

第 21 図

pRai-chu119 の翻訳領域の塩基配列および予測されるアミノ酸配列 (つづき)

```
750      800      810      820      830      840
ACCATCCAGCTGATCCAGAACCATTTTGTGGACGAATACGACCCCACTCTAGAGGATTCC
T I Q L I Q N H F V D E Y D P T L E D S

850      860      870      880      890      900
TACCGGAAGCAGGTGGTCATTGATGGGGAGACGTGCCTGTTGGACATCCTGGATACCGCC
Y R K Q V V I D G E T C L L D I L D T A

910      920      930      940      950      960
GGCCAGGAGGAGTACAGCGCCATGCGGGACCACTACATGCGCACCGGGGAGGGCTTCCTG
G Q E E Y S A M R D Q Y H R T G E G F L

970      980      990      1000      1010      1020
TGTGTGTTTGCCATCAACAACCAAGTCTTTTGAGGACATCCACCAGTACAGGGAGCAG
C V F A I N N T K S F E D I H Q Y R E Q

1030      1040      1050      1060      1070      1080
ATCAAACGGGTGAAGGACTCGGATGACGTGCCCATGGTGCTGGTGGGGAACAAGTGTGAC
I K R V K D S D D V P M V L V G N K C D

1090      1100      1110      1120      1130      1140
CTGGCTGCACGCACTGTGGAATCTCGGCAGGCTCAGGACCTCGCCCGAAGCTACGGCATC
L A A R T V E S R Q A Q D L A R S Y G I

1150      1160      1170      1180      1190      1200
CCCTACATCGAGACCTCGGCCAAGACCCGGCAGGGAGTGGAGGATGCCTTCTACACGTTG
P Y I E T S A K T R Q G V E D A F Y T L

1210      1220      1230      1240      1250      1260
GTGCGTGAGATCCGGCAGCACAAGCTGCGGAAGCTGAACGGCTCCGGAGGTGGTACCCCT
V R E I R Q H K L R K L N G S G G G T P

1270      1280      1290      1300      1310      1320
TCTAAGACAAGCAACTATCCGTGTTTTCTTGCCGAACAAGCAAAGAACAGTGGTCAAT
S K T S N T I R V F L P H K Q R T V V N

1330      1340      1350      1360      1370      1380
GTGCGAAATGGAATGAGCTTGCACTGCCTTATGAAAGCACTCAAGGTGAGGGGCGCTG
V R N G M S L H D C L M K A L K V R G L

1390      1400      1410      1420      1430      1440
CAACCAGAGAGCTGTGCAGTGTTTCAGACTTCTCCACGAACACAAAGGTAAAAAAGCACGC
Q P E S C A V F R L L H E H K G K K A R

1450      1460      1470      1480      1490      1500
TTAGATTGGAATACTGAAGCTGCGTCTTTGATTGGAGAAGAAGTTCACGTAGATTTCCTG
L D W H T E A A S L I G E E L H V D F L

1510      1520      1530      1540      1550      1560
GGCGGCCGCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTC
G G R M V S K G E E L F T G V V P I L V

1570      1580      1590      1600      1610      1620
GAGCTGGACGCGACGTAACGCGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGCGAGGGCGAT
E L D G D V N G H K F S V S G E G E G D

1630      1640      1650      1660      1670      1680
GCCACCTACGGCAAGCTGACCTTGAAGTTCATCTGCACCAACCGGCAAGCTGCGCGTGCC
A T Y G K L T L K F I C T T G K L P V P

1690      1700      1710      1720      1730      1740
TGGCCACCCCTCGTGACCAACCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGAC
```

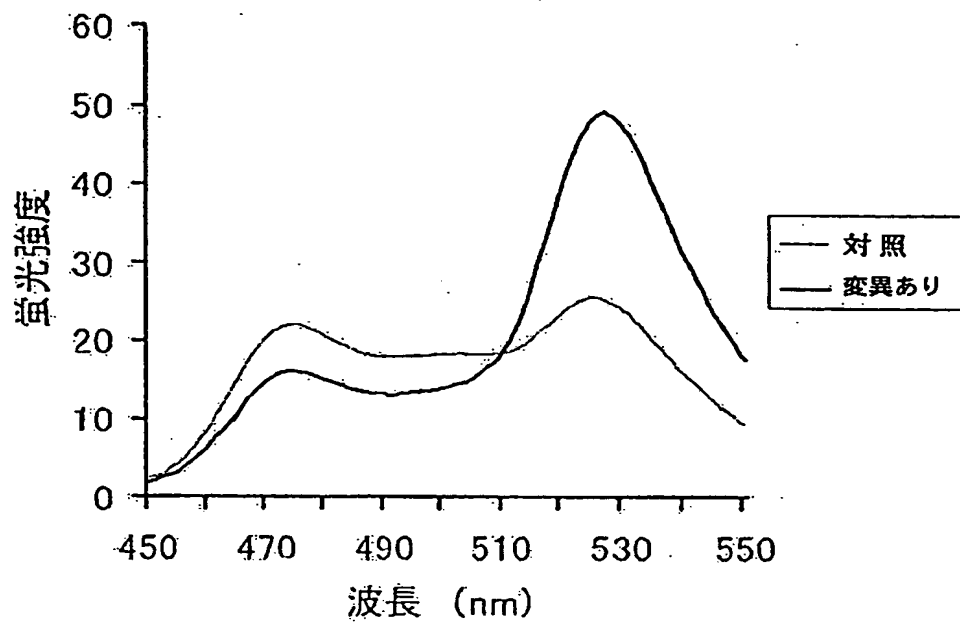
第 22 図

pRai-chu119 の翻訳領域の塩基配列および予測されるアミノ酸配列 (つづき)

W P T L V T T L T W G V Q C F S R Y P D
1750 1760 1770 1780 1790 1800
CACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGC
H M K Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R
1810 1820 1830 1840 1850 1860
ACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTTCGAGGGC
T I F F K D D G N Y K T R A E V K F E G
1870 1880 1890 1900 1910 1920
GACACECTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATC
D T L V N R I E L K G I D F K E D G N I
1930 1940 1950 1960 1970 1980
CTGGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACATCAGCCACAACGTCTATATCACC GCCGACAAG
L G H K L E Y N Y I S H N V Y I T A D K
1990 2000 2010 2020 2030 2040
CAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTG
Q K N G I K A N F K I R H N I E D G S V
2050 2060 2070 2080 2090 2100
CAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCC
Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P
2110 2120 2130 2140 2150 2160
GACAACCACTACTTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGAT
D N H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D
2170 2180 2190 2200 2210 2220
CACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTG
H M V L L E F V T A A G I T L G M D E L
2230
TAG
★

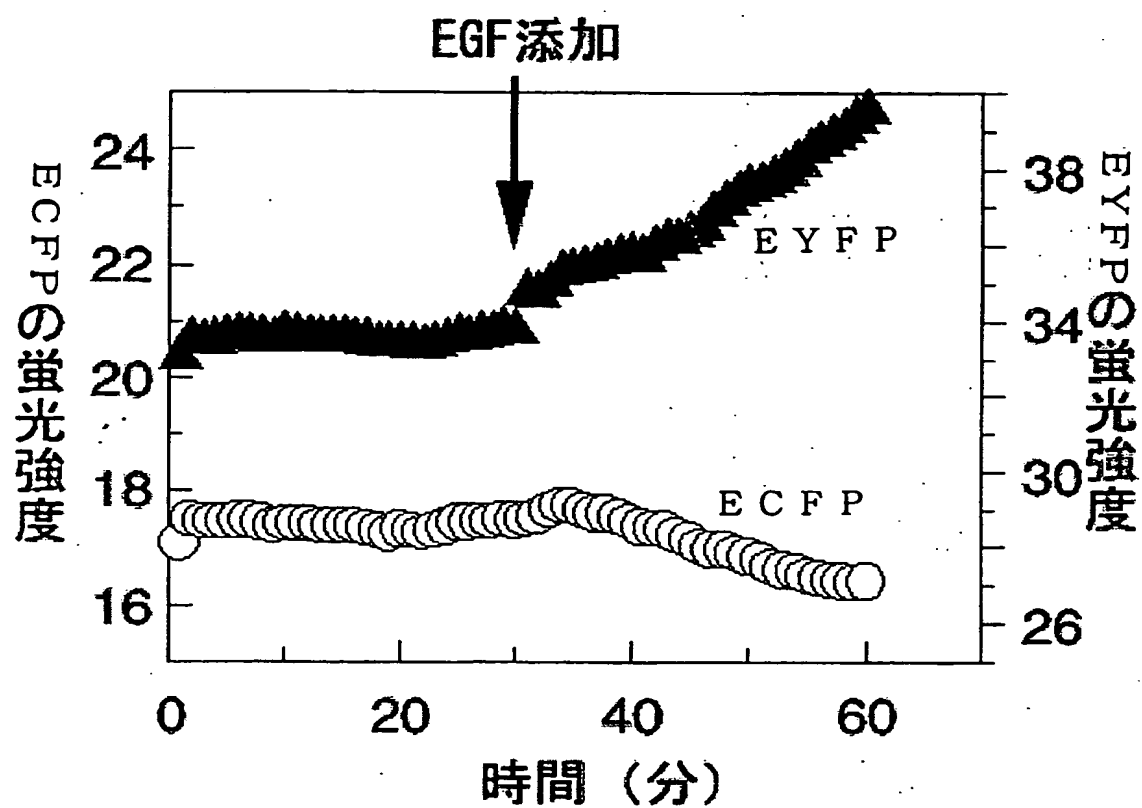
第 23 図

Rai-chu119 の蛍光プロフィール



第 24 図

24/25



第25図

SEQUENCE LISTING

<110> Matsuda, Michiyuki

<120> Monitoring protein for low-molecular-weight GTP-binding
protein activity

<130> 01-022-PCT

<150> 2000-245910

<151> 2000-08-14

<160> 29

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed primer
based on nucleotide sequences of human H-Ras and
restriction site for XhoI

<400> 1

ctcgagatga cggaatataa gctgggtggtg

30

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed primer
based on nucleotide sequences of human c-Raf1 and
human H-Ras

<400> 2

agtgttgctt gtcttagaag gggtagacc tccggagccg ttcagcttcc gcagcttgtg 60

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed primer

based on nucleotide sequences of human c-Raf1 and
restriction site for KpnI

<400> 3

ggtacccctt ctaagacaag caacact

27

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed primer
based on nucleotide sequences of human c-Raf1 and
restriction site for NotI

<400> 4

gcggccgccc aggaaatcta ctggaagttc

30

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed primer
based on nucleotide sequence of multiple cloning
site of pBluescript-SKII(+)

<400> 5

cgccagggtt ttcccgatca cgac

24

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed primer
based on nucleotide sequence of multiple cloning
site of pBluescript-SKII(+)

<400> 6

agcggataac aatttcacac aggaaac

27

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed primer
based on nucleotide sequences of aequorea EYFP and
restriction site for BamHI

<400> 7

ggatccggca tggtagcaa gggcgaggag

30

<210> 8

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed primer
based on nucleotide sequences of aequorea ECFP and
restriction sites for BamHI, KpnI and XhoI

<400> 8

ggatccggta cctcgagctt gtacagctcg tccatg

36

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed primer
based on nucleotide sequences of aequorea ECFP and
restriction site for NotI

<400> 9

gcggccgcat ggtgagcaag ggcgaggagc

30

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed primer
based on nucleotide sequences of aequorea ECFP and
restriction site for BglII

<400> 10

agatctacag ctcgtccatg ccgagag

27

<210> 11

<211> 2223

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed

plasmid based on nucleotide sequences of human

H-Ras, human c-Raf1, aequorea EYFP and aequorea

ECFP

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2223)

<400> 11

atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg 48

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1

5

10

15

gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc 96

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

20

25

30

gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc 144

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile

35

40

45

tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc 192

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr

50

55

60

ttc ggc tac ggc ctg aag tgc ttc gcc cgc tac ccc gac cac atg aag 240

Phe Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys

65

70

75

80

cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag 288

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu

85

90

95

cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag 336

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu

100

105

110

gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc 384

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly

115

120

125

atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac 432

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr

130

135

140

aac tac aac agc cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac 480

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn

145

150

155

160

ggc atc aag gtg aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc 528

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser

165

170

175

gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc 576

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly

180

185

190

ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc tac cag tcc gcc ctg 624

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu

195

200

205

agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc 672

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe

210

215

220

gtg acc gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag ctc 720

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu

225

230

235

240

gag atg acg gaa tat aag ctg gtg gtg gtg ggc gcc ggc ggt gtg ggc 768

Glu Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly
245 250 255

aag agt gcg ctg acc atc cag ctg atc cag aac cat ttt gtg gac gaa 816
Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu
260 265 270

tac gac ccc act ata gag gat tcc tac cgg aag cag gtg gtc att gat 864
Tyr Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp
275 280 285

ggg gag acg tgc ctg ttg gac atc ctg gat acc gcc ggc cag gag gag 912
Gly Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu
290 295 300

tac agc gcc atg cgg gac cag tac atg cgc acc ggg gag ggc ttc ctg 960
Tyr Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu
305 310 315 320

tgt gtg ttt gcc atc aac aac acc aag tct ttt gag gac atc cac cag 1008
Cys Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His Gln
325 330 335

tac agg gag cag atc aaa cgg gtg aag gac tcg gat gac gtg ccc atg 1056
Tyr Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met
340 345 350

gtg ctg gtg ggg aac aag tgt gac ctg gct gca cgc act gtg gaa tct 1104
Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Ala Ala Arg Thr Val Glu Ser
355 360 365

cgg cag gct cag gac ctc gcc cga agc tac ggc atc ccc tac atc gag 1152
Arg Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Tyr Ile Glu
370 375 380

acc tcg gcc aag acc cgg cag gga gtg gag gat gcc ttc tac acg ttg 1200
Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu
385 390 395 400

gtg cgt gag atc cgg cag cac aag ctg cgg aag ctg aac ggc tcc gga 1248
Val Arg Glu Ile Arg Gln His Lys Leu Arg Lys Leu Asn Gly Ser Gly
405 410 415

ggt ggt acc cct tct aag aca agc aac act atc cgt gtt ttc ttg ccg 1296
Gly Gly Thr Pro Ser Lys Thr Ser Asn Thr Ile Arg Val Phe Leu Pro
420 425 430

aac aag caa aga aca gtg gtc aat gtg cga aat gga atg agc ttg cat 1344
Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Asn Val Arg Asn Gly Met Ser Leu His
435 440 445

gac tgc ctt atg aaa gca ctc aag gtg agg ggc ctg caa cca gag agc 1392

Asp Cys Leu Met Lys Ala Leu Lys Val Arg Gly Leu Gln Pro Glu Ser

450

455

460

tgt gca gtg ttc aga ctt ctc cac gaa cac aaa ggt aaa aaa gca cgc 1440

Cys Ala Val Phe Arg Leu Leu His Glu His Lys Gly Lys Lys Ala Arg

465

470

475

480

tta gat tgg aat act gaa gct gcg tct ttg att gga gaa gaa ctt cac 1488

Leu Asp Trp Asn Thr Glu Ala Ala Ser Leu Ile Gly Glu Glu Leu His

485

490

495

gta gat ttc ctg ggc ggc cgc atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc 1536

Val Asp Phe Leu Gly Gly Arg Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe

500

505

510

acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc 1584

Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly

515

520

525

cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc 1632

His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly

530

535

540

aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc 1680

Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro

545

550

555

560

tgg ccc acc ctc gtg acc acc ctg acc tgg ggc gtg cag tgc ttc agc 1728

Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser

565

570

575

cgc tac ccc gac cac atg aag cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg 1776

Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met

580

585

590

ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc 1824

Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly

595

600

605

aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg 1872

Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val

610

615

620

aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc 1920

Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile

625

630

635

640

ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac atc agc cac aac gtc tat atc 1968

Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile

645

650

655

acc gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gcc aac ttc aag atc cgc 2016

Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg

660

665

670

cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag 2064

His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln

675

680

685

aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac 2112

Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr

690

695

700

ttg agc acc cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat 2160

Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp

705

710

715

720

cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc ggg atc act ctc ggc 2208

His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly

725

730

735

atg gac gag ctg tag

2223

Met Asp Glu Leu

740

<210> 12

<211> 740

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Designed

plasmid based on nucleotide sequences of human

H-Ras, human c-Raf1, aequorea EYFP and aequorea

ECFP

<400> 12

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile

35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr

50 55 60

Phe Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys

65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu

85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu

100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly

115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr

130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160
Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
165 170 175
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180 185 190
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu
195 200 205
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
210 215 220
Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu
225 230 235 240
Glu Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly
245 250 255
Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu
260 265 270
Tyr Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp
275 280 285
Gly Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu
290 295 300
Tyr Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu
305 310 315 320
Cys Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His Gln
325 330 335
Tyr Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met
340 345 350

Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Ala Ala Arg Thr Val Glu Ser
355 360 365

Arg Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Tyr Ile Glu
370 375 380

Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu
385 390 395 400

Val Arg Glu Ile Arg Gln His Lys Leu Arg Lys Leu Asn Gly Ser Gly
405 410 415

Gly Gly Thr Pro Ser Lys Thr Ser Asn Thr Ile Arg Val Phe Leu Pro
420 425 430

Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Asn Val Arg Asn Gly Met Ser Leu His
435 440 445

Asp Cys Leu Met Lys Ala Leu Lys Val Arg Gly Leu Gln Pro Glu Ser
450 455 460

Cys Ala Val Phe Arg Leu Leu His Glu His Lys Gly Lys Lys Ala Arg
465 470 475 480

Leu Asp Trp Asn Thr Glu Ala Ala Ser Leu Ile Gly Glu Glu Leu His
485 490 495

Val Asp Phe Leu Gly Gly Arg Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe
500 505 510

Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly
515 520 525

His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly
530 535 540

Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro
545 550 555 560

Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser
565 570 575
Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met
580 585 590
Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly
595 600 605
Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val
610 615 620
Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile
625 630 635 640
Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile
645 650 655
Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg
660 665 670
His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln
675 680 685
Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr
690 695 700
Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp
705 710 715 720
His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly
725 730 735
Met Asp Glu Leu
740

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed primer
based on nucleotide sequences of human Rap1A and
restriction site for XhoI

<400> 13

ggctcgagat gcgtgagtac aagctagtgg

30

<210> 14

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed primer
based on nucleotide sequences of human RalGDS
and human Rap1A

<400> 14

gcggatgata cagcagtcgc cacctccgga tccgccgga cctccaccac cggttccacc 60

tccggagcca ttgatctttg actttgcaga ag

92

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed primer
based on nucleotide sequence of human RalGDS

<400> 15

ggcgactgct gtatcatccg c

21

<210> 16

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed primer
based on nucleotide sequences of human RalGDS
and restriction site for NotI

<400> 16

cgcggccgcc ccgcttcttg aggacaaagt c

31

<210> 17

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed primer
based on nucleotide sequences of aequorea ECFP and
restriction sites for BamHI, KpnI and XhoI

<400> 17

ggatccggta cctcgagggc ggcggtcacg aactccagca g

41

<210> 18

<211> 2238

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
plasmid based on nucleotide sequences of human

Rap1A, human RalGDS, aequorea EYFP and aequorea
ECFP

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2238)

<400> 18

atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg 48

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1

5

10

15

gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc 96

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

20

25

30

gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc 144

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile

35

40

45

tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc 192

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr

50

55

60

ttc ggc tac ggc ctg aag tgc ttc gcc cgc tac ccc gac cac atg aag 240

Phe Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys

65	70	75	80
cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag 288			
Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu			
85	90	95	
cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag 336			
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu			
100	105	110	
gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc 384			
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly			
115	120	125	
atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac 432			
Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr			
130	135	140	
aac tac aac agc cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac 480			
Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn			
145	150	155	160
ggc atc aag gtg aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc 528			
Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser			
165	170	175	

gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc 576
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly

180

185

190

ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc tac cag tcc gcc ctg 624
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu

195

200

205

agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc 672
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe

210

215

220

gtg acc gcc gcc ctc gag atg cgt gag tac aag cta gtg gtc ctt ggt 720
Val Thr Ala Ala Leu Glu Met Arg Glu Tyr Lys Leu Val Val Leu Gly
225 230 235 240

tca gga ggc gtt ggg aag tct gct ctg aca gtt cag ttt gtt cag gga 768
Ser Gly Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Val Gln Phe Val Gln Gly

245

250

255

att ttt gtt gaa aaa tat gac cca acg ata gaa gat tcc tac aga aag 816
Ile Phe Val Glu Lys Tyr Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys

260

265

270

caa gtt gaa gtc gat tgc caa cag tgt atg ctc gaa atc ctg gat act 864
Gln Val Glu Val Asp Cys Gln Gln Cys Met Leu Glu Ile Leu Asp Thr

275 280 285

gca ggg aca gag caa ttt aca gca atg agg gat ttg tat atg aag aac 912
Ala Gly Thr Glu Gln Phe Thr Ala Met Arg Asp Leu Tyr Met Lys Asn

290 295 300

ggc caa ggt ttt gca cta gta tat tct att aca gct cag tcc acg ttt 960
Gly Gln Gly Phe Ala Leu Val Tyr Ser Ile Thr Ala Gln Ser Thr Phe

305 310 315 320

aac gac tta cag gac ctg agg gaa cag att tta cgg gtt aag gac acg 1008
Asn Asp Leu Gln Asp Leu Arg Glu Gln Ile Leu Arg Val Lys Asp Thr

325 330 335

gaa gat gtt cca atg att ttg gtt ggc aat aaa tgt gac ctg gaa gat 1056
Glu Asp Val Pro Met Ile Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Glu Asp

340 345 350

gag cga gta gtt ggc aaa gag cag ggc cag aat tta gca aga cag tgg 1104
Glu Arg Val Val Gly Lys Glu Gln Gly Gln Asn Leu Ala Arg Gln Trp

355 360 365

tgt aac tgt gcc ttt tta gaa tct tct gca aag tca aag atc aat gtt 1152
Cys Asn Cys Ala Phe Leu Glu Ser Ser Ala Lys Ser Lys Ile Asn Val

370 375 380

aat gag ata ttt tat gac ctg gtc aga cag ata aat agg aaa aca cca 1200
 Asn Glu Ile Phe Tyr Asp Leu Val Arg Gln Ile Asn Arg Lys Thr Pro
 385 390 395 400

gtg gaa ggc tcc gga ggt gga acc ggt ggt gga ggt acc ggc gga tcc 1248
 Val Glu Gly Ser Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Ser
 405 410 415

gga ggt ggc gac tgc tgt atc atc cgc gtc agc ctg gac gtg gac aat 1296
 Gly Gly Gly Asp Cys Cys Ile Ile Arg Val Ser Leu Asp Val Asp Asn
 420 425 430

ggc aac atg tac aag agc atc ctg gtg acc agc caa gat aag gct ccg 1344
 Gly Asn Met Tyr Lys Ser Ile Leu Val Thr Ser Gln Asp Lys Ala Pro
 435 440 445

gct gta atc cgc aag gcc atg gac aaa cac aac ctg gag gag gag gag 1392
 Ala Val Ile Arg Lys Ala Met Asp Lys His Asn Leu Glu Glu Glu Glu
 450 455 460

ccg gag gac tat gag ctg ctg cag att ctc tca gat gac cgg aag ctg 1440
 Pro Glu Asp Tyr Glu Leu Leu Gln Ile Leu Ser Asp Asp Arg Lys Leu
 465 470 475 480

aag atc cct gaa aac gcc aac gtc ttc tat gcc atg aac tct acc gcc 1488
 Lys Ile Pro Glu Asn Ala Asn Val Phe Tyr Ala Met Asn Ser Thr Ala

485	490	495	
aac tat gac ttt gtc ctc aag aag cgg ggc ggc cgc atg gtg agc aag 1536			
Asn Tyr Asp Phe Val Leu Lys Lys Arg Gly Gly Arg Met Val Ser Lys			
500	505	510	
ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac 1584			
Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp			
515	520	525	
ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc 1632			
Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly			
530	535	540	
gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc 1680			
Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly			
545	550	555	560
aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ctg acc tgg ggc 1728			
Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly			
565	570	575	
gtg cag tgc ttc agc cgc tac ccc gac cac atg aag cag cac gac ttc 1776			
Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe			
580	585	590	

ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc 1824
Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe

595

600

605

ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag 1872
Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu

610

615

620

ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag 1920
Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys

625

630

635

640

gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac atc agc 1968
Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser

645

650

655

cac aac gtc tat atc acc gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gcc 2016
His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala

660

665

670

aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc 2064
Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala

675

680

685

gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg 2112
Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu

690 695 700

ccc gac aac cac tac ttg agc acc cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc 2160
Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro
705 710 715 720

aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc 2208
Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala
725 730 735

ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tag 2238
Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu
740 745

<210> 19

<211> 745

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Designed

plasmid based on nucleotide sequences of human

Rap1A, human c-RalGDS, aequorea EYFP and aequorea

ECFP.

<400> 19

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1 5 10 15
Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30
Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45
Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60
Phe Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80
Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125
Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140
Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160
Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
165 170 175
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180 185 190
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu
195 200 205
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe

210 215 220
Val Thr Ala Ala Leu Glu Met Arg Glu Tyr Lys Leu Val Val Leu Gly
225 230 235 240
Ser Gly Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Val Gln Phe Val Gln Gly
245 250 255
Ile Phe Val Glu Lys Tyr Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys
260 265 270
Gln Val Glu Val Asp Cys Gln Gln Cys Met Leu Glu Ile Leu Asp Thr
275 280 285
Ala Gly Thr Glu Gln Phe Thr Ala Met Arg Asp Leu Tyr Met Lys Asn
290 295 300
Gly Gln Gly Phe Ala Leu Val Tyr Ser Ile Thr Ala Gln Ser Thr Phe
305 310 315 320
Asn Asp Leu Gln Asp Leu Arg Glu Gln Ile Leu Arg Val Lys Asp Thr
325 330 335
Glu Asp Val Pro Met Ile Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Glu Asp
340 345 350
Glu Arg Val Val Gly Lys Glu Gln Gly Gln Asn Leu Ala Arg Gln Trp
355 360 365
Cys Asn Cys Ala Phe Leu Glu Ser Ser Ala Lys Ser Lys Ile Asn Val
370 375 380
Asn Glu Ile Phe Tyr Asp Leu Val Arg Gln Ile Asn Arg Lys Thr Pro
385 390 395 400
Val Glu Gly Ser Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Ser
405 410 415
Gly Gly Gly Asp Cys Cys Ile Ile Arg Val Ser Leu Asp Val Asp Asn

420	425	430
Gly Asn Met Tyr Lys Ser Ile Leu Val Thr Ser Gln Asp Lys Ala Pro		
435	440	445
Ala Val Ile Arg Lys Ala Met Asp Lys His Asn Leu Glu Glu Glu Glu		
450	455	460
Pro Glu Asp Tyr Glu Leu Leu Gln Ile Leu Ser Asp Asp Arg Lys Leu		
465	470	475
Lys Ile Pro Glu Asn Ala Asn Val Phe Tyr Ala Met Asn Ser Thr Ala		
485	490	495
Asn Tyr Asp Phe Val Leu Lys Lys Arg Gly Gly Arg Met Val Ser Lys		
500	505	510
Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp		
515	520	525
Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly		
530	535	540
Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly		
545	550	555
Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly		
565	570	575
Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe		
580	585	590
Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe		
595	600	605
Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu		
610	615	620
Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys		

625	630	635	640
Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser			
	645	650	655
His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala			
	660	665	670
Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala			
	675	680	685
Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu			
	690	695	700
Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro			
	705	710	715
Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala			
	725	730	735
Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu			
	740	745	

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed primer
based on nucleotide sequences of human R-Ras and
restriction site for XhoI

<400> 20

ccccctcgaga cacacaagct ggtggtc

27

<210> 21

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed primer
based on nucleotide sequences of human R-Ras and
restriction site for KpnI

<400> 21

gccggtaccg ccactgggag ggctcggtgg gag

33

<210> 22

<211> 2223

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed

plasmid based on nucleotide sequences of human
R-Ras, human c-Raf1, aequorea EYFP and aequorea
ECFP

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2223)

<400> 22

atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg 48
Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc 96
Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30

gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc 144
Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc 192
Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

ttc ggc tac ggc ctg aag tgc ttc gcc cgc tac ccc gac cac atg aag 240

Phe Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80

cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag 288
 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95

cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag 336
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110

gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc 384
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125

atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac 432
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140

aac tac aac agc cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac 480
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160

ggc atc aag gtg aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc 528
 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175

gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc 576
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly

180

185

190

ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc tac cag tcc gcc ctg 624
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu

195

200

205

agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc 672
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe

210

215

220

gtg acc gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag ctc 720
Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu

225

230

235

240

gag aca cac aag ctg gtg gtc gtg ggc ggc ggc ggc gtg ggc aag agc 768
Glu Thr His Lys Leu Val Val Val Gly Gly Gly Gly Val Gly Lys Ser

245

250

255

gcg ctg acc atc cag ttc atc cag tcc tac ttc gtg tct gac tac gac 816
Ala Leu Thr Ile Gln Phe Ile Gln Ser Tyr Phe Val Ser Asp Tyr Asp

260

265

270

ccc act att gag gac tcc tac acg aag atc tgc agt gtg gat ggc atc 864

Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Thr Lys Ile Cys Ser Val Asp Gly Ile

275

280

285

cca gcc cgg ctg gac atc ctg gac acc gcg ggc cag gaa gag ttc ggg 912

Pro Ala Arg Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Phe Gly

290

295

300

gcc atg aga gag cag tac atg cgt gct ggc cac ggc ttc ctg ctg gtg 960

Ala Met Arg Glu Gln Tyr Met Arg Ala Gly His Gly Phe Leu Leu Val

305

310

315

320

ttc gcc att aat gac cgg cag agt ttc aac gag gtg ggc aag ctc ttc 1008

Phe Ala Ile Asn Asp Arg Gln Ser Phe Asn Glu Val Gly Lys Leu Phe

325

330

335

acg cag att ctg cgg gtc aag gac cgc gac gac ttc ccc gtt gtg ttg 1056

Thr Gln Ile Leu Arg Val Lys Asp Arg Asp Asp Phe Pro Val Val Leu

340

345

350

gtc ggg aac aag gca gat ctg gag tca cag cgc cag gtc ccc cga tca 1104

Val Gly Asn Lys Ala Asp Leu Glu Ser Gln Arg Gln Val Pro Arg Ser

355

360

365

gaa gcc tct gcc ttc ggc gcc tcc cac cac gtg gcc tac ttt gag gcc 1152

Glu Ala Ser Ala Phe Gly Ala Ser His His Val Ala Tyr Phe Glu Ala

370

375

380

tcg gcc aaa ctg cgt ctc aac gtg gac gag gct ttt gag cag ctg gtg 1200
Ser Ala Lys Leu Arg Leu Asn Val Asp Glu Ala Phe Glu Gln Leu Val
385 390 395 400

cgg gct gtc cgg aaa tac cag gaa caa gag ctc cca ccg agc cct ccc 1248
Arg Ala Val Arg Lys Tyr Gln Glu Gln Glu Leu Pro Pro Ser Pro Pro
405 410 415

agt ggt acc cct tct aag aca agc aac act atc cgt gtt ttc ttg ccg 1296
Ser Gly Thr Pro Ser Lys Thr Ser Asn Thr Ile Arg Val Phe Leu Pro
420 425 430

aac aag caa aga aca gtg gtc aat gtg cga aat gga atg agc ttg cat 1344
Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Asn Val Arg Asn Gly Met Ser Leu His
435 440 445

gac tgc ctt atg aaa gca ctc aag gtg agg ggc ctg caa cca gag agc 1392
Asp Cys Leu Met Lys Ala Leu Lys Val Arg Gly Leu Gln Pro Glu Ser
450 455 460

tgt gca gtg ttc aga ctt ctc cac gaa cac aaa ggt aaa aaa gca cgc 1440
Cys Ala Val Phe Arg Leu Leu His Glu His Lys Gly Lys Lys Ala Arg
465 470 475 480

tta gat tgg aat act gaa gct gcg tct ttg att gga gaa gaa ctt cac 1488

Leu Asp Trp Asn Thr Glu Ala Ala Ser Leu Ile Gly Glu Glu Leu His

485

490

495

gta gat ttc ctg ggc ggc cgc atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc 1536

Val Asp Phe Leu Gly Gly Arg Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe

500

505

510

acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc 1584

Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly

515

520

525

cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc 1632

His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly

530

535

540

aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc 1680

Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro

545

550

555

560

tgg ccc acc ctc gtg acc acc ctg acc tgg ggc gtg cag tgc ttc agc 1728

Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser

565

570

575

cgc tac ccc gac cac atg aag cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg 1776

Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met

580

585

590

ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc 1824
Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly
595 600 605

aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg 1872
Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val
610 615 620

aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc 1920
Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile
625 630 635 640

ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac atc agc cac aac gtc tat atc 1968
Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile
645 650 655

acc gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gcc aac ttc aag atc cgc 2016
Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg
660 665 670

cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag 2064
His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln
675 680 685

aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac 2112

Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr
 690 695 700

ttg agc acc cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat 2160
 Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp
 705 710 715 720

cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc ggg atc act ctc ggc 2208
 His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly
 725 730 735

atg gac gag ctg tag 2223
 Met Asp Glu Leu
 740

<210> 23

<211> 740

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
 plasmid based on nucleotide sequences of human
 R-Ras, human c-Raf1, aequorea EYFP and aequorea
 ECFP

<400> 23

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60
 Phe Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
 145 150 155 160
 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu
 195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
210 215 220
Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu
225 230 235 240
Glu Thr His Lys Leu Val Val Val Gly Gly Gly Gly Val Gly Lys Ser
245 250 255
Ala Leu Thr Ile Gln Phe Ile Gln Ser Tyr Phe Val Ser Asp Tyr Asp
260 265 270
Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Thr Lys Ile Cys Ser Val Asp Gly Ile
275 280 285
Pro Ala Arg Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Phe Gly
290 295 300
Ala Met Arg Glu Gln Tyr Met Arg Ala Gly His Gly Phe Leu Leu Val
305 310 315 320
Phe Ala Ile Asn Asp Arg Gln Ser Phe Asn Glu Val Gly Lys Leu Phe
325 330 335
Thr Gln Ile Leu Arg Val Lys Asp Arg Asp Asp Phe Pro Val Val Leu
340 345 350
Val Gly Asn Lys Ala Asp Leu Glu Ser Gln Arg Gln Val Pro Arg Ser
355 360 365
Glu Ala Ser Ala Phe Gly Ala Ser His His Val Ala Tyr Phe Glu Ala
370 375 380
Ser Ala Lys Leu Arg Leu Asn Val Asp Glu Ala Phe Glu Gln Leu Val
385 390 395 400
Arg Ala Val Arg Lys Tyr Gln Glu Gln Glu Leu Pro Pro Ser Pro Pro
405 410 415

Ser Gly Thr Pro Ser Lys Thr Ser Asn Thr Ile Arg Val Phe Leu Pro
420 425 430
Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Asn Val Arg Asn Gly Met Ser Leu His
435 440 445
Asp Cys Leu Met Lys Ala Leu Lys Val Arg Gly Leu Gln Pro Glu Ser
450 455 460
Cys Ala Val Phe Arg Leu Leu His Glu His Lys Gly Lys Lys Ala Arg
465 470 475 480
Leu Asp Trp Asn Thr Glu Ala Ala Ser Leu Ile Gly Glu Glu Leu His
485 490 495
Val Asp Phe Leu Gly Gly Arg Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe
500 505 510
Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly
515 520 525
His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly
530 535 540
Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro
545 550 555 560
Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser
565 570 575
Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met
580 585 590
Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly
595 600 605
Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val
610 615 620

Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile
625 630 635 640
Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile
 645 650 655
Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg
 660 665 670
His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln
 675 680 685
Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr
 690 695 700
Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp
705 710 715 720
His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly
 725 730 735
Met Asp Glu Leu
 740

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed primer
based on nucleotide sequence of human H-Ras

<400> 24

ggaatcctct agagtgggt cg

22

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed primer
based on nucleotide sequence of human H-Ras

<400> 25

cgaccccact ctagaggatt cc

22

<210> 26

<211> 2223

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed
plasmid based on nucleotide sequences of human

H-Ras, human c-Raf1, aequorea EYFP and aequorea
ECFP

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2223)

<400> 26

atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg 48

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1 5 10 15

gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc 96

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

20 25 30

gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc 144

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile

35 40 45

tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc 192

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr

50 55 60

ttc ggc tac ggc ctg aag tgc ttc gcc cgc tac ccc gac cac atg aag 240

Phe Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys

65	70	75	80	
cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag				288
Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu				
	85	90	95	
cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag				336
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu				
	100	105	110	
gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc				384
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly				
	115	120	125	
atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac				432
Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr				
	130	135	140	
aac tac aac agc cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac				480
Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn				
	145	150	155	160
ggc atc aag gtg aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc				528
Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser				
	165	170	175	

gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc 576
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly

180

185

190

ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc tac cag tcc gcc ctg 624
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu

195

200

205

agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc 672
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe

210

215

220

gtg acc gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag ctc 720
Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu

225

230

235

240

gag atg acg gaa tat aag ctg gtg gtg gtg ggc gcc ggc ggt gtg ggc 768
Glu Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly

245

250

255

aag agt gcg ctg acc atc cag ctg atc cag aac cat ttt gtg gac gaa 816
Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu

260

265

270

tac gac ccc act cta gag gat tcc tac cgg aag cag gtg gtc att gat 864
Tyr Asp Pro Thr Leu Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp

275 280 285

ggg gag acg tgc ctg ttg gac atc ctg gat acc gcc ggc cag gag gag 912
Gly Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu

290 295 300

tac agc gcc atg cgg gac cag tac atg cgc acc ggg gag ggc ttc ctg 960
Tyr Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu

305 310 315 320

tgt gtg ttt gcc atc aac aac acc aag tct ttt gag gac atc cac cag 1008
Cys Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His Gln

325 330 335

tac agg gag cag atc aaa cgg gtg aag gac tcg gat gac gtg ccc atg 1056
Tyr Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met

340 345 350

gtg ctg gtg ggg aac aag tgt gac ctg gct gca cgc act gtg gaa tct 1104
Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Ala Ala Arg Thr Val Glu Ser

355 360 365

cgg cag gct cag gac ctc gcc cga agc tac ggc atc ccc tac atc gag 1152
Arg Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Tyr Ile Glu

370 375 380

acc tcg gcc aag acc cgg cag gga gtg gag gat gcc ttc tac acg ttg 1200
Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu
385 390 395 400

gtg cgt gag atc cgg cag cac aag ctg cgg aag ctg aac ggc tcc gga 1248
Val Arg Glu Ile Arg Gln His Lys Leu Arg Lys Leu Asn Gly Ser Gly
405 410 415

ggt ggt acc cct tct aag aca agc aac act atc cgt gtt ttc ttg ccg 1296
Gly Gly Thr Pro Ser Lys Thr Ser Asn Thr Ile Arg Val Phe Leu Pro
420 425 430

aac aag caa aga aca gtg gtc aat gtg cga aat gga atg agc ttg cat 1344
Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Asn Val Arg Asn Gly Met Ser Leu His
435 440 445

gac tgc ctt atg aaa gca ctc aag gtg agg ggc ctg caa cca gag agc 1392
Asp Cys Leu Met Lys Ala Leu Lys Val Arg Gly Leu Gln Pro Glu Ser
450 455 460

tgt gca gtg ttc aga ctt ctc cac gaa cac aaa ggt aaa aaa gca cgc 1440
Cys Ala Val Phe Arg Leu Leu His Glu His Lys Gly Lys Lys Ala Arg
465 470 475 480

tta gat tgg aat act gaa gct gcg tct ttg att gga gaa gaa ctt cac 1488
Leu Asp Trp Asn Thr Glu Ala Ala Ser Leu Ile Gly Glu Glu Leu His

485	490	495	
gta gat ttc ctg ggc ggc cgc atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc			1536
Val Asp Phe Leu Gly Gly Arg Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe			
500	505	510	
acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc			1584
Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly			
515	520	525	
cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc			1632
His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly			
530	535	540	
aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc			1680
Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro			
545	550	555	560
tgg ccc acc ctc gtg acc acc ctg acc tgg ggc gtg cag tgc ttc agc			1728
Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser			
565	570	575	
cgc tac ccc gac cac atg aag cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg			1776
Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met			
580	585	590	

ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc 1824

Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly

595

600

605

aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg 1872

Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val

610

615

620

aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc 1920

Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile

625

630

635

640

ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac atc agc cac aac gtc tat atc 1968

Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile

645

650

655

acc gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gcc aac ttc aag atc cgc 2016

Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg

660

665

670

cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag 2064

His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln

675

680

685

aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac 2112

Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr

690

695

700

ttg agc acc cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat 2160
 Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp
 705 710 715 720

cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc ggg atc act ctc ggc 2208
 His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly
 725 730 735

atg gac gag ctg tag 2223
 Met Asp Glu Leu
 740

<210> 27

<211> 740

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:Designed

plasmid based on nucleotide sequences of human

H-Ras, human c-Raf1, aequorea EYFP and aequorea

ECFP

<400> 27

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1	5	10	15												
Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly
20				25				30							
Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile
35				40				45							
Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr
50				55				60							
Phe	Gly	Tyr	Gly	Leu	Lys	Cys	Phe	Ala	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys
65				70				75				80			
Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu
85				90				95							
Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu
100				105				110							
Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly
115				120				125							
Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr
130				135				140							
Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn
145				150				155				160			
Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser
165				170				175							
Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly
180				185				190							
Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Gln	Ser	Ala	Leu
195				200				205							
Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe

210 215 220
Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Leu
225 230 235 240
Glu Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly
245 250 255
Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu
260 265 270
Tyr Asp Pro Thr Leu Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp
275 280 285
Gly Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu
290 295 300
Tyr Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu
305 310 315 320
Cys Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His Gln
325 330 335
Tyr Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met
340 345 350
Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Ala Ala Arg Thr Val Glu Ser
355 360 365
Arg Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Tyr Ile Glu
370 375 380
Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu
385 390 395 400
Val Arg Glu Ile Arg Gln His Lys Leu Arg Lys Leu Asn Gly Ser Gly
405 410 415
Gly Gly Thr Pro Ser Lys Thr Ser Asn Thr Ile Arg Val Phe Leu Pro

420	425	430
Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Asn Val Arg Asn Gly Met Ser Leu His		
435	440	445
Asp Cys Leu Met Lys Ala Leu Lys Val Arg Gly Leu Gln Pro Glu Ser		
450	455	460
Cys Ala Val Phe Arg Leu Leu His Glu His Lys Gly Lys Lys Ala Arg		
465	470	475
Leu Asp Trp Asn Thr Glu Ala Ala Ser Leu Ile Gly Glu Glu Leu His		
485	490	495
Val Asp Phe Leu Gly Gly Arg Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe		
500	505	510
Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly		
515	520	525
His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly		
530	535	540
Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro		
545	550	555
Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser		
565	570	575
Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met		
580	585	590
Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly		
595	600	605
Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val		
610	615	620
Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile		

625 630 635 640
Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile
 645 650 655
Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg
 660 665 670
His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln
 675 680 685
Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr
 690 695 700
Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp
705 710 715 720
His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly
 725 730 735
Met Asp Glu Leu
 740

<210> 28

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed primer
based on nucleotide sequence of human c-Raf1

<400> 28

ctcgagcctt ctaagacaag caacact

27

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed primer
based on nucleotide sequence of aequorea ECFP

<400> 29

cgtcgccgtc cagctcgacc ag

22

THIS PAGE BLANK (USPTO)